



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Diversidad de efectores *Avr-blb1*, *Avr-vnt1* y *Avr-blb2*
de *Phytophthora infestans* en el linaje clonal EC-1 en
relación a los genes R: *Rpi-blb1* (RB), *Rpi-vnt1* y *Rpi-blb2***

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología

Molecular

AUTOR

Myriam Lorena IZARRA BECERRA

ASESORES

Pablo Sergio RAMIREZ ROCA

Hannele LINDQVIST-KREUZE (Coasesor)

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Izarra, M. (2018). *Diversidad de efectores Avr-blb1, Avr-vnt1 y Avr-blb2 de Phytophthora infestans en el linaje clonal EC-1 en relación a los genes R: Rpi-blb1 (RB), Rpi-vnt1 y Rpi-blb2*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Revisado por;

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 154-UPG-FCB-2017

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO
DE MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

Siendo las 12:05 horas del día 28.03.2018 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado Examinador presidido por:

Mg. Patricia Gloria Woll Toso	e integrado por
Dr. Pedro Luis Castellanos Sánchez	(Miembro)
Mg. Gustavo Adolfo Sandoval Peña	(Miembro)
Dr. Enrique Walter Mamani Zapana	(Miembro)
Dr. Pablo Sergio Ramírez Roca	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara la Bachiller Doña **MYRIAM LORENA IZARRA BECERRA.**

Después de darse lectura al Expediente N° 154-UPG-FCB-17, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

"DIVERSIDAD DE EFECTORES *Avr-blb1*, *Avr-vnt1* Y *Avr-blb2* DE *PHYTOPHTHORA INFESTANS* EN EL LINAJE CLONAL EC-1 EN RELACIÓN A LOS GENES R: *Rpi-blb1* (RB), *Rpi-vnt1* Y *Rpi-blb2*", y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: *Muy Bueno con la nota de 18*

A continuación la Presidente del Jurado Examinador recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en *Biología Molecular* a la Bachiller *Myriam Lorena Izarra Becerra*

Siendo las *13:10* se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, a los 28 días del mes de marzo del año 2018.

Mg. Patricia Gloria Woll Toso
Profesora Principal a D.E.
PRESIDENTE

Dr. Pablo Sergio Ramírez Roca
Profesor Principal a D.E.
ASESOR

Dr. Pedro Luis Castellanos Sánchez
Profesor Principal a T. C.
MIEMBRO

Mg. Gustavo Adolfo Sandoval Peña
Profesor Asociado a T.C.
MIEMBRO

Dr. Enrique Walter Mamani Zapana
Profesor Auxiliar a T.C.
MIEMBRO

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio Biotecnología Aplicada del Centro Internacional de la Papa (CIP) sede Lima, siendo financiado por USAID y CRP-RTB.

AGRADECIMIENTOS

En primer punto en la tesis agradecer el apoyo que siempre me brindó la PhD. Hannele Lindqvist-Kreuze. Ya que sin su consentimiento nada de esto se hubiera podido lograr. Gracias Hannele por su confianza depositada en mí y la oportunidad de seguir aprendiendo siempre más.

A la Blga. Soledad Gamboa quien me permitió comenzar mi estudio en el tema de *Phytophthora infestans*. Gracias por el cariño depositado en mí.

A los PhD. Jan Kreuze y Marc Ghislain quienes sin sus “sí” tampoco nada de esto se hubiera podido lograr.

A los PhD(c). Alfredo Berrocal, Yvette Ludeña y María Lupe Román quienes me ayudaron en mis dudas científicas.

A los miembros del Laboratorio de Patología Molecular y Micología. MgSc Ing Willmer Perez, Técnicos Freddy Ventura y Elvis De la Torre, quienes con su apoyo me facilitaron mi trabajo.

A mis amigas del CIP: Rocío Alagón, Pamela Alcázar, Elizabeth Fernández y Mariela Aponte por alentarme en mis metas personales y profesionales.

A mi familia, Gracias Mamá por apoyarme hasta el final de este logro profesional, Papá por estar orgulloso de nosotros y apoyarme siempre, a mis hermanitos que siempre me han cuidado y apoyado.

Al principal, A Dios, por permitirme llegar a obtener mi grado de Magíster con éxito.

ÍNDICE

	Pág.
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
III. Hipótesis y Objetivos	21
IV. Materiales y Métodos	22
V. Resultados	29
VI. Discusiones	49
VII. Conclusiones	55
VIII. Recomendaciones	56
IX. Referencias Bibliográficas	57
X. Anexos	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Phytophthora infestans</i> .	9
Figura 2. Librería para el ARNseq	14
Figura 3. Reconstrucción de transcritos desde lecturas de ARN-seq	17
Figura 4. Agresividad de las cepas de <i>P. infestans</i> POX067, POX096, POX106, POX110 y POX109 en los genotipos Yungay y LBr40 de la papa en la cámara de frío.	29
Figura 5. Extracción de ARN ribosomal de muestras de folíolos Yungay inoculados con POX067 y POX109, en los 1, 2 y 3 dpi, mostrando una repetición biológica de izquierda a derecha.	30
Figura 6. Extracción de ARN ribosomal de muestras de folíolos Yungay inoculados con POX096, POX106 y POX110, en los 1, 2 y 3 dpi, mostrando una repetición biológica de izquierda a derecha.	30
Figura 7. Distribución de los niveles de expresión, según CummeRbund, para todos los genes en condiciones experimentales simuladas POX067 y POX109.	33
Figura 8. Similitudes generales y diferencias específicas entre condiciones POX067y POX109 según CummeRbund.	33
Figura 9. Análisis significativo de la expresión diferencial de genes.	35
Figura 10. Árbol filogenético Neighbor-Joining basado en las secuencias de las variantes IPI-O y las secuencias consenso de las lecturas de las muestras Yungay-POX067 y Yungay-POX109 mapeadas a las secuencias tipo IPI-O.	37
Figura 11. Variantes alélicas de <i>Avr-blb2</i> . Números de lecturas que abarcan el SNP del aa69 que es crucial para el reconocimiento por <i>Rpi-blb2</i> .	38

Figura 12. Variantes alélicas de <i>Avr-blb2</i> en la posición 69 vía PCR seguido por clonamiento y secuenciamiento de las cepas POX067 y POX109 es representado por el rectángulo color verde.	38
Figura 13. Alineamiento de secuencia de ADN de las variantes de <i>Avr-vnt1</i> en POX067 (PITG_16294 y PITG_22547).	39
Figura 14. Variantes alélicas de <i>lpiO</i> para las cinco muestras Yungay inoculadas con las cepas POX109, POX067, POX096, POX106 y POX110 mediante cebadores específicos.	40
Figura 15. Resultados de RT-PCR con cebadores <i>Avr-vnt1SP</i> (393pb), <i>ef2α</i> (182pb), y <i>Avr3a</i> (169pb) de folíolos de Yungay inoculados con cepas POX067, POX109, POX096, POX106 y POX110.	41
Figura 16. Cuantificación de diluciones seriadas de ADNc usando cebadores de <i>ef2α</i> .	43
Figura 17. Curvas de disociación con 1 pico.	44
Figura 18. Niveles de expresión relativa de genes PITG de <i>P. infestans</i>	45
Figura 19. Agresividad de las cepas de <i>P. infestans</i> POX109 y POX067 en los eventos transgénicos 6, 2, 3, 13, 22, 55 en Desiree conteniendo el gen <i>Rpi-vnt1</i> .	46
Figura 20. Respuestas de inoculaciones con las cepas de <i>P. infestans</i> POX109 y POX067 al 3 dpi.	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de cepas de <i>P. infestans</i> basadas en pruebas de infección usando el set diferencial de 11 genes <i>Rpi</i> de <i>S. demissum</i>	23
Tabla 2. Secuencias de los cebadores de PCR utilizados en qRT-PCR y RT-PCR	28
Tabla 3. Estadísticas de mapeo de dos bibliotecas de ARNseq alineadas al genoma de referencia de <i>P. infestans</i> usando Bowtie 2.	32
Tabla 4. Expresión de genes PITG entre las dos cepas acorde a cuffdiff.	34
Tabla 5. Reporte de SNPs en las lecturas alineadas a <i>Avr-blb1</i> (PITG_21388) y <i>Avr-blb2</i> (PITG_04085).	36

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Genes que mostraron diferencias significativas entre cepas por el análisis de <i>cuffdiff</i> sin filtrado.	66
Anexo 2. Curvas de disociación de los productos de PCR amplificados con los pares de cebadores mostrados en la tabla 2, cada gen fue analizado al 3dpi.	67
Anexo 3. Resultados de ANOVA para los genes de la tabla 2 analizadas sus expresiones relativas por el programa SAS®.	68

ÍNDICE DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

TT: Tizón Tardío

P. infestans: *Phytophthora infestans*

Avr: gen de avirulencia

R: gen de resistencia

CIP: Centro Internacional de la Papa

T_a: Temperatura de anillamiento

dpi: días posteriores a la inoculación

ef2α: factor de elongación de *P. infestans*

PITG: *Phytophthora infestans*, cepa T30-4

S. tuberosum: *Solanum tuberosum*

S. demissum: *Solanum demissum*

S. bulbocastanum: *Solanum bulbocastanum*

S. venturii: *Solanum venturii*

A. tumefaciens: *Agrobacterium tumefaciens*

RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) está propensa a la enfermedad de Tizón Tardío, causada por el oomiceto patógeno *Phytophthora infestans* (*P. infestans*), el cual secreta cientos de efectores que actúan como factores de virulencia. Poco se conoce sobre la diversidad de genes de virulencia de las cepas pertenecientes al linaje de reproducción clonal EC-1. En la presente tesis, mediante el secuenciamiento del transcriptoma de la interacción papa-*P. infestans* de los primeros días después de la infección, se identificó la expresión diferencial de genes efectores tipo RXLR en dos cepas aisladas del centro de los Andes Peruanos de *P. infestans* EC-1, siendo confirmada por qRT-PCR. Los genes efectores, fueron silenciados en una cepa, para *Avr-vnt1* en POX109 y para el homólogo *Avh9.1* en POX067, pero expresados en la otra. Además, los resultados de transcriptoma fueron comparados con tres cepas adicionales del linaje EC-1. En el análisis de SNPs de *Avr-blb1*, *Avr-blb2* y *Avr-vnt1*, la variabilidad alélica no tuvo predominancia frente a la variabilidad de expresión de genes. Asimismo, debido al silenciamiento génico de *Avr-vnt1* se evaluó la expresión de estos en plantas transgénicas [*Rpi-vnt1.1*] a fin de encontrar si la resistencia transgénica era funcional. Encontrando que en ambas cepas en todos los eventos y en el control susceptible Yungay se expresan, a diferencia del resultado anterior. El descubrimiento de efectores silenciados en las poblaciones del patógeno pueden guiar al uso de genes R específicos en los programas de mejoramiento genético. Pudiendo el gen *Rpi-vnt1* no ser recomendado.

Palabras claves: *Avr-blb1*, *Avr-blb2*, *Avr-vnt1*, genes de avirulencia, *Phytophthora infestans*.

ABSTRACT

The potato (*Solanum tuberosum* L.) is prone to the disease known Late blight caused by the oomycete pathogen *Phytophthora infestans* (*P. infestans*), which secrete a hundred of effectors that act as virulence factors. Little is known of the diversity of virulence genes of the strains that belong to a clonally reproducing lineage EC-1. In this thesis, through the transcriptome sequencing of potato and *P. infestans* interaction of first day's post inoculation, were identified the differential expression, we identified differentially expressed RXLR type effector genes in two *P. infestans* isolates EC-1, isolated from Peruvian Andes, being confirmed by qRT-PCR. Effector genes, were silenced in one isolate, such as *Avr-vnt1* in POX109 and for *Avh9.1* homolog in POX067, but expressed in the other. Also, the transcriptomics results were compared with three additional isolates from the EC-1 lineage. In the SNPs analysis of *Avr-blb1*, *Avr-blb2* y *Avr-vnt1*, the allelic variability doesn't have predominance in front of genes expression variability. Likewise, due to genetic silencing of *Avr-vnt1* we evaluated the expression of this in transgenic plants [*Rpi-vnt1*] in the way to find if the transgenic resistance was functional. Finding that both strains in all events and susceptible control have expression in contrast to the previous results. Discovery of silenced effectors in the pathogen populations can guide the use of specific R genes in the breeding programs. *Rpi-vnt1* can be not a recommended gene.

Key words: *Avr-blb1*, *Avr-blb2*, *Avr-vnt1*, avirulence genes, *Phytophthora infestans*.

I. INTRODUCCIÓN

El Tizón Tardío (TT) es la enfermedad que ataca a la papa, causada por el patógeno oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. Los cambios continuos en el mundo de las poblaciones de éste han hecho del manejo del TT una labor complicada. La enfermedad causa una pérdida anual de más de \$6 billones (Haverkort *et al.*, 2008). *P. infestans* infecta hojas, tallos, frutos y tubérculos (Fry, 2008). El éxito del patógeno no sólo reside en su elevada virulencia sino también en su remarcable capacidad de adaptarse rápidamente a plantas resistentes (Haas *et al.*, 2009). Durante las primeras etapas de la infección, *P. infestans* secreta una gran variedad de efectores, que son proteínas que actúan como instrumentos cruciales para el estilo de vida parasitario, son secretados dentro de los espacios extracelulares y en el citoplasma de la planta (Gijzen *et al.*, 2014). La revolución genómica está permitiendo a los investigadores hacer un tremendo progreso en términos de entender las interacciones planta-patógeno (Fry *et al.*, 2015). La identificación de los primeros genes de los efectores de avirulencia (*Avr*), junto con el proyecto de secuenciamiento del genoma completo de *P. infestans*, reveló una clase especial de efectores que son secretados al interior de las células hospederas (Dong *et al.*, 2009). Estos son los efectores citoplasmáticos, los cuales son llevados dentro de las células vegetales vía el haustorio. La clase citoplasmática más estudiada es la familia de proteínas RXLR, los cuales contienen un motivo conservado requerido para su translocación (Kamoun, 2006). Hay 563 genes codificantes de efectores RXLR, los cuales muestran una amplia variabilidad y están distribuidos en islas génicas. Así mismo su aparición se debió a un rápido proceso de recombinación en la región de RXLR, creando nuevas formas virulentas (Haas *et al.*, 2009).

En un sistema planta-patógeno, la resistencia específica es manifestada por una reacción de hipersensibilidad (RH) que produce una necrosis localizada en el sitio de infección, lo que restringe al patógeno al sitio de la lesión, impidiendo su expansión a otros sitios de la planta debido a que el producto de un gen de resistencia dominante de la planta "*Rpi*", interactúa específicamente con un elicitor específico de la raza del patógeno, producto de un gen genéticamente dominante de avirulencia (*Avr*) (Cornelissen & Melchers, 1993). En interacciones incompatibles no se induce la RH y se puede establecer una relación biotrófica,

resultando en la muerte de la planta (Vleeshouwers *et al.*, 2000).

Entre las características de las poblaciones de *P. infestans* en el Perú, se evidenció un sólo tipo de apareamiento (A1) y en cuanto a los linajes clonales a EC-1, US-1 (papa cultivada), PE-3 y PE-7 (variedades nativas o silvestres) (Perez *et al.*, 2001; Garry *et al.*, 2005). Esto indica que el patógeno esta coevolucionando con el hospedero y adaptándose a las prácticas agroindustriales de cada región (Gilchrist Ramelli *et al.*, 2009). A nivel mundial, se ha reportado la existencia de reproducción sexual en México (Forbes *et al.*, 1998), Norte América (Kato *et al.*, 1997), Europa (Drenth *et al.*, 1994) y Asia (Ghimire *et al.*, 2003), y en cuanto a los linajes clonales la mayoría de las poblaciones pertenecen al genotipo US-1 en África, (Pule *et al.*, 2013), en Europa (Goodwin, 1997) y en Asia (Guo *et al.*, 2008). En el caso de Norte América están presentes los linajes US-1, US-6, US-7 y US-8 (Goodwin, 1997; Goodwin *et al.*, 1994), y en México linaje clonal US:8,14,21,22,24,11,12,17,20 (Wang *et al.*, 2017).

Debido a que la misión del Centro Internacional de la Papa (CIP) es lograr la seguridad alimentaria, el bienestar y la equidad de género para las poblaciones más pobres del mundo basado en cultivos de papa (Perez, 2008), es necesario que el cultivo de papa se encuentre con la mayor calidad posible y sea resistente a esta enfermedad. Por este motivo, el CIP ha trabajado en genes *Rpi* en mejoramiento genético de la resistencia (Rivera *et al.*, 2009; Orbegozo *et al.*, 2016; Román *et al.*, 2015), pero la problemática reside en que poco se conoce de los genes *Avr* y su estudio es de necesidad debido a que la resistencia de la planta depende de la composición del gen *Avr* de las cepas de *P. infestans*, con énfasis en las cepas del linaje clonal (definido por marcadores) EC-1 que es el que domina en los andes peruanos (Garry *et al.*, 2005). Así también, será posible identificar los genes que determinan la funcionabilidad de la resistencia transgénica, y así detectar su nivel de resistencia, identificando las cepas que pueden o no vencerla.

II. ANTECEDENTES

2.1 *Solanum tuberosum*

A pesar que los tubérculos de papa tienen un valor económico significativo, no están completamente estudiados los factores involucrados en su desarrollo. Los tubérculos de la papa se forman desde una raíz bajo el suelo llamado estolón, pudiendo variar su desarrollo según sean días cortos o largos. Así, diversos factores ambientales y hormonales pueden afectar su desarrollo (Jackson, 1999; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). La peridermis de la papa está hecha de tres tipos de células: felema, felógeno y tejidos de felodermis (Lulai & Freeman, 2001), la cual forma una barrera protectora en la superficie del tubérculo (van Eck, 2007). Las células tuberosas de papa contienen amiloplastos que son responsables de la síntesis y almacenamiento de gránulos de almidón, a través de la polimerización de glucosa. Ellas también convierten este almidón en azúcar cuando la planta necesita energía. Los tubérculos de papa contienen vitaminas y minerales que están siendo identificados como vitales para la nutrición humana. Nutricionalmente, la papa es el más conocido por su contenido completo y balance de almidón/proteínas/vitaminas. La forma predominante del carbohidrato es el almidón (16 y 20%), los otros componentes son: agua (72-75%), proteína (2-2.5%), fibra (1-1.8%) y ácidos grasos (0.15%) (FAO, 2008).

La importancia de su investigación surgió a raíz de los efectos del TT sobre este cultivo. En Irlanda, en los 1840s, esto causó efectos inmediatos de pobreza y hambruna (Erwin & Ribeiro, 1996; Day & Shattock, 1997). Así mismo, esta enfermedad está presente en todas las áreas paperas del mundo y es considerada como la más importante de este cultivo.

2.2 Resistencia del Tubérculo

Por resistencia se entiende la respuesta que el hospedero desarrolla para evitar el mayor daño posible del patógeno. Las primeras barreras que posee la planta son su estructura vegetal y química. Las variaciones en los componentes químicos de la planta pueden afectar el proceso de atracción del patógeno por el hospedero (De Jong & De Snoo, 2002). Las plantas tempranas contienen

receptores transmembrana en su superficie celular capaces de reconocer los patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs) los cuales activan los patrones de la inmunidad (PTI) (Tameling & Takken, 2008; Haverkort *et al.*, 2016). Ciertos patógenos se adaptan evadiendo el reconocimiento o suprimiendo la defensa activa de la planta, siguiendo el modelo zigzag. A fin de contrarrestar esto, existe una segunda barrera de receptores de inmunidad codificadas por genes *R* (Jones & Dangl, 2006).

Las resistencias pueden agruparse como sigue: a) resistencia a la infección, también denominada resistencia de campo o resistencia horizontal; y b) hipersensibilidad, también denominado resistencia extrema o inmunidad. La primera, controlada por genes menores y aditivos y generalmente de baja expresividad, tiene la ventaja de una mayor estabilidad a largo plazo porque se mantiene en presencia de razas nuevas del patógeno (Estrada, 2000). Así, una raza cero sería incapaz de infectar una planta que tenga genes *R*, mientras que una raza 1 puede atacar el genotipo R1, pero no R2, R3, R4, etc. (Driver, 1958). En el caso de la segunda, está controlada por genes mayores de alta expresividad y dominancia, su efecto es más impresionante porque muestra una mayor sanidad, pero su estabilidad en el tiempo no es tan segura debido a las mutaciones del patógeno utilizadas para sobrepasar la acción de un solo gen (Estrada, 2000).

Las plantas cuentan con genes *R* contra las enfermedades. Estos son ampliamente estudiados en especies monocotiledóneas y dicotiledóneas. La clase mayor de proteínas *R* son consideradas como proteínas modulares (Tameling & Takken, 2008). Los genes *R* tienden a ocurrir en “clusters” y son siempre encontrados en regiones con alta concentración de elementos repetidos (Michelmore & Meyers, 1998; Wei *et al.*, 2002). Los genes de resistencia contra *P. infestans* (*Rpi*) son más fáciles de introducir en comparación que los QTLs (locus de carácter cuantitativo). Sin embargo, la introducción de genes de resistencia mayores, específicos de raza, se ve limitada por la complejidad de las razas de la mayoría de poblaciones de *P. infestans* y la prevalencia de ambos tipos de apareamiento (Rodewald & Trognitz, 2013). Estos genes típicamente codifican proteínas inmunes receptoras de la clase de proteínas intracelulares de plantas. Las cuales se caracterizan por una cola de enrollamiento, uniones nucleotídicas y regiones ricas de leucina (CC-NB-LRR) (Jones & Dangl, 2006). Inicialmente, 11 genes de resistencia (*R*) originados de *Solanum demissum* (*S. demissum*) han sido

incorporados en varios cultivares de papa, todos estos le confieren resistencia raza específica. En el campo esta resistencia tiene corta duración, así nuevas razas de patógenos pueden vencerla rápidamente (Song *et al.*, 2003). El mejoramiento contemporáneo de papa para la resistencia a *P. infestans* está explorando la riqueza de la diversidad de los genes *R* en una amplia gama de tubérculos *Solanum* sección especie *Petota*, construyendo así una colección de diversos genes *Rpi* mediante su clonamiento, incrementándose rápidamente este set diferencial (Kuhl *et al.*, 2001; Jacobs *et al.*, 2010; Hein *et al.*, 2009; Hein *et al.*, 2007; Rauscher *et al.*, 2006; Sandbrink *et al.*, 2000; Smilde *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2008; Villamon *et al.*, 2005). El monitoreo de la virulencia a través de los genes *Rpi* en diferentes localidades geográficas usando el set de genes clásicos o genéticamente modificados permite integrar estrategias de control de las enfermedades (Jo *et al.*, 2016).

El CIP ha estado trabajando en una aproximación transgénica para obtener una variedad de papa resistente al TT para África. El cultivar de papa ‘Desiree’ y ‘Victoria/Asante’ ha sido transformado con tres genes de resistencia (*R*) al TT: *Rpi-blb1* (RB), *Rpi-vnt1* y *Rpi-blb2* con el objetivo de obtener una resistencia durable, siendo medidos los rendimientos con cepas peruanas de *P. infestans* (Magembe *et al.*, 2013). Entre estas tenemos:

***Rpi-blb1*:** Conocido también como RB, fue aislado de especies de papa silvestre de *S. bulbocastanum* de México, codifica a la proteína CC-NB-LRR de 970 aminoácidos (aa's) y está localizado en el cromosoma VIII (Vleeshouwers *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2003).

***Rpi-blb2*:** Fue aislado por clonamiento posicional y originado de *S. bulbocastanum* en México. El marco de lectura abierto codifica un polipéptido de 1267 aminoácidos (aa's), y pertenece a las proteínas CC-NB-LRR, está localizado en el brazo corto del cromosoma VI (Vleeshouwers *et al.*, 2011; Vossen *et al.*, 2005). A nivel aminoacídico comparte 82% de identidad con la proteína Mi-1. El gen *Mi-1* de tomate confiere resistencia al nemátodo *Meloidogyne incognita* (Milligan *et al.*, 1998).

***Rpi-vnt1*:** Fue el primer gen *Rpi* en ser clonado desde una planta de origen Sudamericano. Tres alelos altamente similares fueron aislados de tres diferentes accesiones de *S. venturii* *Rpi-vnt1.1*, *Rpi-vnt1.2*, *Rpi-vnt1.3*.

Codifica a una proteína de 891 aa's CC-NB-LRR y está localizado en el cromosoma IX (Vleeshouwers et al., 2008).

2.3 Enfermedad del Tizón Tardío

Es una de las más devastadoras enfermedades de las plantas, causada por el oomiceto *P. infestans*, causante de pérdidas económicas significativas en diferentes áreas de cultivo de papa en el mundo. El manejo de la enfermedad aún reside en la aplicación de fungicidas (por ejemplo, metalaxyl combinado con carbamato o combinación de Cymoxanil y Mancozeb) (Mukerji, 2004), el cual es caro y dañino para el ambiente (De Jong & De Snoo, 2002). Entre los costos ambientales están los relacionados a la contaminación de las aguas subterráneas, así como costos energéticos de la aplicación y posibles efectos adversos en la salud humana (Haverkort et al., 2016).

En la interacción *S. tuberosum*/*P. infestans*, el tipo de resistencia más comúnmente estudiada es la resistencia específica a razas, la cual está gobernada por un sólo gen de resistencia de carácter dominante (gen *R*), el cual sería efectivo contra una determinada raza del patógeno, pero se rompe fácilmente por una evolución rápida del patógeno, por lo que es poco durable en el campo (Estrada, 2000). Por lo tanto, ha surgido la necesidad del conocimiento completo del patosistema, es decir el conocimiento de los genes *Avr* que son reconocidos por un gen *R*, debido a que los genes *Avr* en la mayoría de los casos se presentan con un gen *R* específico del huésped (Vleeshouwers et al., 2000).

2.4 *Phytophthora infestans*

P. infestans pertenece a la clase del oomiceto el cual forma un diverso grupo de microorganismos eucarióticos que está relacionado cercanamente con las algas marrones y diatomeas en el reino Stramenopiles (Halterman et al., 2010; Birch et al., 2006). Especies del género de *Phytophthora*, son los patógenos más devastadores de plantas dicotiledóneas. La mayoría de hospederos pertenecen a la familia de Solanaceae.

Según estudios recientes el origen de *P. infestans*, sugiere que fue en México central (Goss et al., 2014). Fue evidenciado por la reproducción sexual presente y la presencia de ambos tipos de apareamiento (Flier et al.,

2001). La dirección de su migración fue estimada usando variación de microsatélites siendo desde México hacia los Andes (Goss et al., 2014). Sin embargo, otros estudios ponen en discusión esta teoría, mediante el estudio del ADN mitocondrial y nuclear, especulando que *P. infestans* prolifera desde América del Sur (Martin et al., 2016; Saville et al., 2016) y pudo haber migrado desde hospederos alternos que no son *S. tuberosum* (Gómez-Alpizar et al., 2008).

El estilo de vida hemibiotrófico de *P. infestans* comprende un ciclo de reproducción sexual y asexual produciendo diferentes formas de esporas: oosporas y zoosporas, respectivamente. La reproducción sexual ocurre entre ambos tipos de apareamiento A1 y A2; cuando crecen juntos, una de ellas puede formar células masculinas (anteridios) y la otra, células femeninas (oogonias). Su fertilización resulta en la oospora que, al contrario de las zoosporas y zoosporangios, puede resistir condiciones desfavorables como sequías y bajas temperaturas. En la reproducción asexual, entre tres a diez días luego de la infección, dependiendo de las condiciones ambientales, esporangiosporas emergen a través de aberturas en la superficie de la hoja (estomas). Las estomas son más frecuentes en el envés que en la superficie de las hojas. Los zoosporangios se desarrollan al final de las esporangiosporas, cuando maduran los zoosporangios se desprenden fácilmente y se propagan por el viento. Estas pueden germinar directa o indirectamente. Directamente, se comportan como esporas individuales, formando tubos germinativos que penetran dentro de la planta e indirectamente cada esporangio libera de 10-20 esporas (zoosporas). Sobre las hojas y raíces, los tubos germinativos pueden directamente penetrar la epidermis de la planta (no es requerido el estoma), y en los tubérculos, los tubos germinativos penetran a través de lenticelas o heridas (Figura 1) (Henfling, 1987; Fry et al., 1992). *P. infestans* como organismo hemibiotrófico, muestra una fase inicial asintomática biotrófica seguido de una fase necrotrófica. En la primera, *P. infestans* forma secuencialmente el apresorio, las hifas primarias y secundarias, y finalmente las estructuras especializadas llamadas haustorias, a través de las cuales proteínas y pequeñas moléculas, llamadas efectores, son llevadas dentro del apoplasto o a las células adyacentes de la planta. Se piensa que estos efectores permiten a los patógenos manipular el metabolismo del hospedero y suprimir sus defensas. La siguiente fase necrotrófica está caracterizada por la

ramificación de las hifas y su posterior pudrición, seguida por la necrosis del tejido (Zuluaga *et al.*, 2016).

Durante los primeros estadios de infección, *P. infestans* secreta efectores dentro del espacio extracelular de la planta y dentro del citoplasma. Estos efectores apoplásticos interactúan con blancos extracelulares como receptores de membrana o proteínas secretadas de la planta, las cuales se clasifican en inhibidores enzimáticos, proteínas ricas en cisteína, y la familia tipo Nep1 (NPL) (Kamoun, 2006). Una importante función es inhabilitar las defensas extracelulares de la planta y permitir al patógeno adaptarse al ambiente rico de proteasa del apoplasto de la planta (Pais *et al.*, 2013). Por otro lado, los efectores citoplasmáticos son llevados dentro de la célula de la planta vía un haustorio y son representados por dos clases: Familia de proteínas RXLR y la familia de proteína Crinkler (CRN) (Kamoun, 2006). Todos los efectores son identificados como el gen de avirulencia (*Avr1*, *Avr2*, *Avr3a*, *Avr4*, *Avr-blb1* y *Avr-blb2*) de interacción con el gen *Rpi* (resistente a *P. infestans*) pertenecientes a la familia de proteínas RXLR (Armstrong *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2009). Este motivo RXLR, Arg-X-Leu-Arg (en el cual X representa cualquier aminoácido), caracteriza un dominio involucrado en la translocación de los efectores dentro de las células hospederas (Birch *et al.*, 2006; Whisson *et al.*, 2007). Así, el despliegue de genes *Avr* es útil para determinar si el gen *Rpi* correspondiente está presente, siendo esto útil como herramienta de diagnóstico. Un pre-requisito para la aplicación de estrategias de mejoramiento del gen *Rpi* es que los genes *Avr* estén disponibles (Collinge, 2016). No obstante, recientes estudios muestran que una mutación puntual en genes efectores y/o NB-LRR puede alterar la especificidad del gen *R* o la función del efector (Pais *et al.*, 2013). Actualmente, están disponibles 10 genes *Avr* relacionados a los genes *Rpi*, incluyendo *Avr1*, *Avr2*, *Avr3a*, *Avr3b*, *Avr4*, *Avr8/AvrSmira2*, *AvrSmira1*, *Avrblb1*, *Avrblb2* y *Avrvnt1*, los cuales han sido probados en la resistencia genéticamente modificada (Vleeshouwers & Oliver, 2014) y en materiales de mejoramiento clásico (Rietman *et al.*, 2012). Así, para nuestro estudio fueron estudiados *Avr-blb1*, *Avr-blb2* y *Avr-vnt1*.

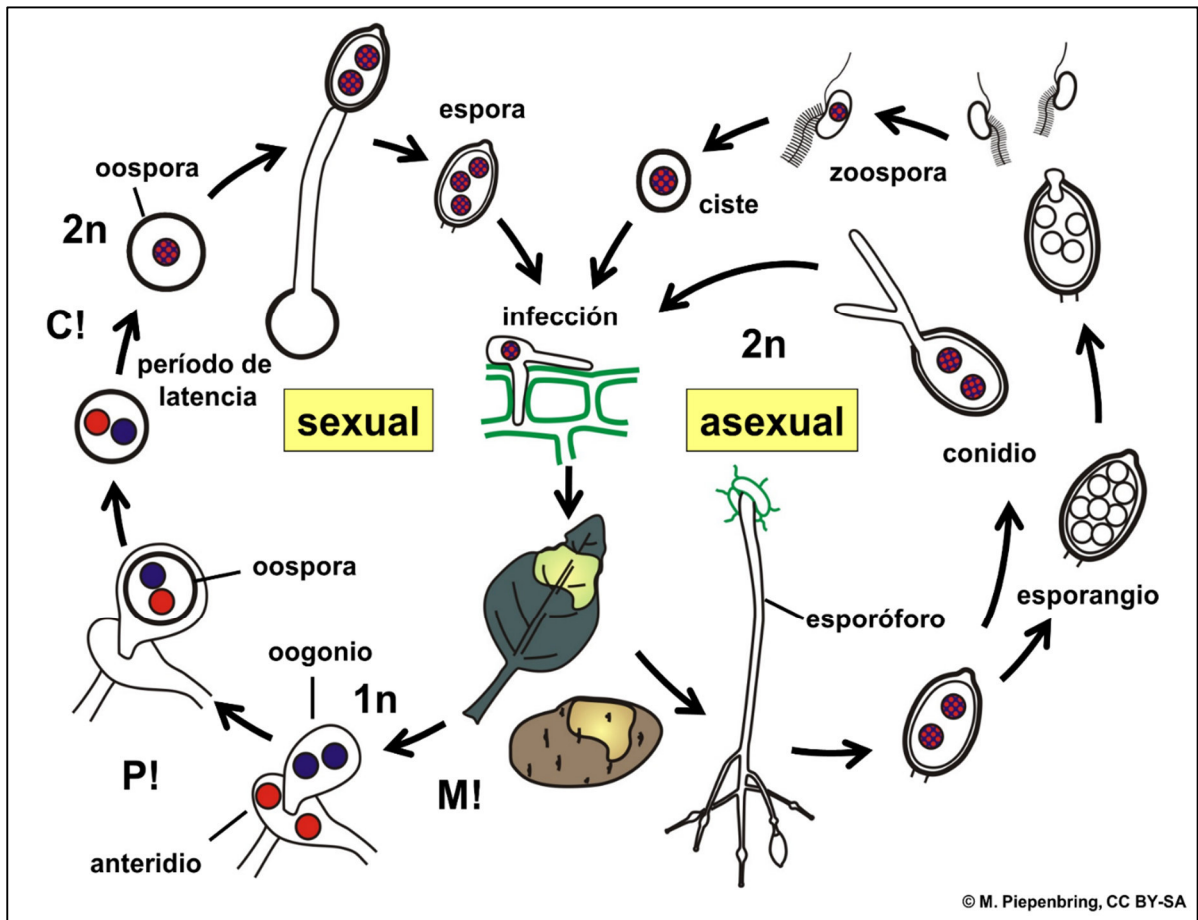


Figura1. Ciclo de vida de *Phytophthora infestans*

Avr-blb1 (*ipiO*): IPI-O pertenece a la clase de efectores de *P. infestans* con un motivo conservado RXLR-N terminal y un motivo W-C terminal. En total, las 16 variantes de *ipiO* son agrupadas entre tres clases: I, II y III, de las cuales la clase I contiene más variantes (*ipiO1*, *ipiO2*, *ipiO5*, *ipiO6*, *ipiO7*, *ipiO8*, *ipiO9*, *ipiO10*, *ipiO11*, *ipiO12*, *ipiOm2*). La ausencia de la clase I de *ipiO* fue correlacionada con la virulencia en plantas *Rpi-blb1*. La clase I y II (*ipiO3*, *ipiO13*), pero no la clase III (*ipiO4*), inducen la muerte celular cuando se coexpresan con *Rpi-blb1*. Adicionalmente, *ipiO4* bloquea el reconocimiento de *ipiO1*, llevando a la inactivación de la muerte celular mediante *Rpi-blb1*, lo que explica el fenotipo virulento en plantas *Rpi-blb1* (Halterman et al., 2010; Chen et al., 2012; Vleeshouwers et al., 2011). Esto sucede mediante la interacción entre IPI-O4 en *P. infestans* y el dominio CC de RB en planta, y entre IPI-O1 y el dominio CC en planta sugiriendo que IPI-O puede afectar la función RB con la interacción en esta región, previniendo la oligomerización CC, o bloqueando una interacción con otros componentes señalizadores. Cuatro aminoácidos en IPI-O, localizados en el C-terminal al motivo RXLR, juegan un rol importante en la interacción RB CC/IPI-O4 y uno de ellos también determina el reconocimiento IPI-O1 por RB (Chen et al., 2012).

Avr-blb2: Fue identificado luego de la búsqueda alélica y búsqueda funcional de genes candidatos del efector RXLR. Pertenece a una familia multigénica con al menos 7 copias duplicadas en el genoma de la cepa de *P. infestans* T-30. El gen codifica una proteína secretada de 100 aminoácidos que es altamente polimórfica y exhibe altas tasas de sustituciones no sinónimas. El pequeño dominio efector de 50 aminoácidos en el C-terminal de AVRblb2 es suficiente para activar *Rpi-blb2*. Además, experimentos de estructura y función indicaron que la región de 34 aa's en C-terminal de AVRblb2 es suficiente para inducir la reacción de hipersensibilidad. También fue encontrado un residuo clave en la posición 69 que comprende la activación de *Rpi-blb2*. Cuando este residuo fue mutado desde Alanina (Ala), Isoleucina (Ile) o Valina (Val) a Fenilalanina (Phe) en *Avr-blb2*, la activación fue suprimida (Oh et al.,

2009). Además, recientemente se ha identificado un aminoácido adicional en *A. tumefaciens* en la posición 69 que es Asparagina (Asn) que debilita la activación del gen *Rpi-blb2*. Sin embargo, su efecto en las poblaciones naturales de *P. infestans* no ha sido detectado aún (Oliva *et al.*, 2015). Interesantemente, diferentes variantes naturales de *Avr-blb2* coexisten con copias avirulentas del gen en el genoma de varias cepas de *P. infestans*. Esto sugiere un beneficio potencial para *P. infestans* en el mantenimiento de copias duplicadas de *Avr-blb2*. Bajo estas condiciones, es menos probable que mutaciones puntuales consecutivas o deleciones en esta posición, permitan la ganancia de virulencia en corto plazo. A pesar de esto, no es predecible si otros mecanismos epigenéticos como el silenciamiento génico o la supresión pueden jugar un rol predominante en la atenuación de avirulencia (Vleeshouwers *et al.*, 2011). Según Haas *et al.* (2009) *Avr-blb2* se presenta como una familia de siete parálogos (PITG_04085, PITG_04086, PITG_04090, PITG_18683, PITG_20300, PITG_20301 y PITG_20303) en el genoma de *P. infestans* T30-4. Oliva *et al.* (2015) confirmó que todos estos tenían baja densidad génica y alto contenido repetitivo.

Avr-vnt1: Fue recientemente identificado usando efectorómica. Un amplio set del genoma expresa RXLR efectores de *P. infestans* fue funcionalmente seleccionado en una resistente *S. venturii* conteniendo *Rpi-vnt1*, y pocos genes candidatos *Avr* fueron encontrados para inducir respuestas de defensa. Un efector, designado *Avr-vnt1*, específicamente induce la muerte celular en la descendencia resistente de una población que segregan para *Rpi-vnt1*. En el genoma de referencia de *P. infestans* T30-4, *Avr-vnt1* se localiza en una región dispersa del gen en un sólo locus (Haas *et al.*, 2009). Sólo tres efectores homólogos RXLR fueron detectados en el genoma T30-4, apuntando a una pequeña familia del gen. En cepas de *P. infestans* que son avirulentos en plantas *Rpi-vnt1*, *Avr-vnt1* es aumentada durante la fase temprana biotrófica de la infección. Sin embargo, en cepas virulentas de América del Sur del linaje clonal EC-1, la secuencia codificante de *Avr-vnt1* estuvo intacta pero su transcrito no fue detectado. Esto sugiere que *Avr-vnt1* evade el

reconocimiento del gen R, por la reducción de la expresión, y por la variación epialélica de secuencias conservadas entre los puntuales alelos avirulentos y virulentos. La identificación de *Avr-vnt1* se logró mediante respuestas en agroinfiltraciones siendo PITG_16294 el que indujo la muerte celular correspondiente. Además, PITG_22547 es su haplotipo (Pel, 2010). Estudios recientes con *Rpi-phu1*, muestran que la expresión de *Avr-vnt1* puede ser cambiante dependiendo de los factores ambientales y del resultado de la interacción patógeno-hospedero, asociado al genotipo de la papa. Así, se confirma que cuando una cepa no expresa *Avr-vnt1* puede vencer la resistencia, así sea sólo en los primeros días después de la infección (Stefańczyk *et al.*, 2017) .

2.5 Reacción de Hipersensibilidad

P. infestans es hábil para infectar todas las partes de las plantas comprendiendo las hojas, tallo, Inflorescencia, y tubérculos. En los 80's, Pathak and Clarke (1987) observaron necrosis la cual fue similar en apariencia a la respuesta de hipersensibilidad (RH). Cuando las proteínas Avirulencia (AVR) y Resistencia (R) presentes en el patógeno y en la planta respectivamente interaccionan, según el modelo de gen por gen (Flor, 1971), se activa una respuesta de resistencia resultando en una respuesta de hipersensibilidad causando necrosis y muerte celular en el sitio de infección. Si uno de estos componentes no está presente en la interacción planta-patógeno no resultará en una respuesta de muerte celular (Dangl *et al.*, 1996). Los cambios tempranos observados siguiendo el reconocimiento del patógeno, incluyen una reacción oxidativa, resultando en producción de Intermediarios de Oxígeno Reactivo (ROIs) y un flujo rápido de iones a través de la membrana plasmática. Los ROIs pueden causar la pérdida de la integridad y viabilidad celular por su elevada reactividad a través de su membrana de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Morel & Dangl, 1997).

2.6 Secuenciamiento del transcriptoma

La tecnología del secuenciamiento de segunda generación constituye un importante avance en la sensibilidad, cuantificación, anotación y alto rendimiento del análisis del transcriptoma referido al ARNseq (Petre *et al.*, 2012).

El transcriptoma es el conjunto completo de transcritos en la célula. En proyectos actuales multidisciplinarios actuales es la primera tecnología 'ómica' en ser utilizada, generando información de que genes se expresan, en qué nivel, y también que isoformas del transcrito son utilizadas (McGettigan, 2013).

En las plantas, el control de la respuesta frente a estados de estrés biótico y abiótico está dado por la regulación de la actividad transcripcional de activación o represión de genes (Sedano & Carrascal, 2012). En este sentido, el secuenciamiento de alto rendimiento de ARNm (ARNseq) ofrece la posibilidad de descubrir nuevos genes y transcritos, y medir la expresión del transcrito en un sólo ensayo. Sin embargo, no sólo se investiga la expresión del gen, sino también el empalme alternativo (Pan *et al.*, 2008), la expresión de transcritos novedosos (Guttman *et al.*, 2010), la expresión de alelos específicos (Degner *et al.*, 2009), los eventos de fusión del gen (Edgren *et al.*, 2011) y variación genética. Comparada con la tecnología tradicional de bajo rendimiento de Sanger, que sólo detecta las transcripciones más abundantes, la enorme profundidad de secuenciación de un experimento típico de ARNseq ofrece un transcriptoma instantáneo casi completo, incluyendo las transcripciones raras que tiene funciones reguladoras. En contraste con otras tecnologías alternativas de alto rendimiento como microarreglos de ARN, el ARNseq logra una resolución a nivel de pares de bases y una gama dinámica mucho mayor de los niveles de expresión, así también se puede utilizar para hacer la anotación *de novo*. Las herramientas de análisis generalmente caen en tres categorías: (i) Alineamientos de lecturas, (ii) Ensamblaje del transcrito o la anotación del genoma, y (iii) Cuantificación del transcrito y del gen (Trapnell *et al.*, 2012).

Muchas tecnologías, incluyendo la desarrollada por Roche (454), Illumina (Analizador del Genoma I/II y Hiseq) y Applied Biosystems (ABI SOLiD), están disponibles para el secuenciamiento de alta generación de moléculas de ADN. La más usada es la tecnología Illumina. La cual comprende los siguientes pasos: 1) Enriquecimiento de un subconjunto de ARNs de un amplio pool de ARN total. Por

ejemplo, ARNm es enriquecido selectivamente con moléculas de poliadenina, 2) fragmentación de ARN, mayoría de plataformas de secuenciadores requieren moléculas de corta longitud (200 a 500 pb). Para lograr esto, largas moléculas tienen que ser fragmentados vía hidrólisis de ARN. Alternativamente, el ADNc más que el ARN puede ser fragmentado luego de la síntesis del ADNc vía tratamiento con ADNasa I (Wang *et al.*, 2009). Este paso también asegura una muestra más uniforme (Mortazavi *et al.*, 2008), 3) Síntesis de doble hebra de ADNc, moléculas de ARN son usadas como molde para la síntesis de moléculas de ADNc (transcripción reversa), 4) Ligación de adaptadores y amplificación de PCR, la doble hebra de ADNc son tratadas para generar extremos romos y adaptadores son ligados a ambos extremos de las moléculas, 5) Selección del tamaño, amplio rango de pesos moleculares son creados, para asegurar una longitud similar, un estrecho rango de longitudes de ADN es purificada por extracción del gel, 6) Síntesis por secuenciamiento, los fragmentos pueden ser secuenciados en uno o en ambos extremos (Figura 2).

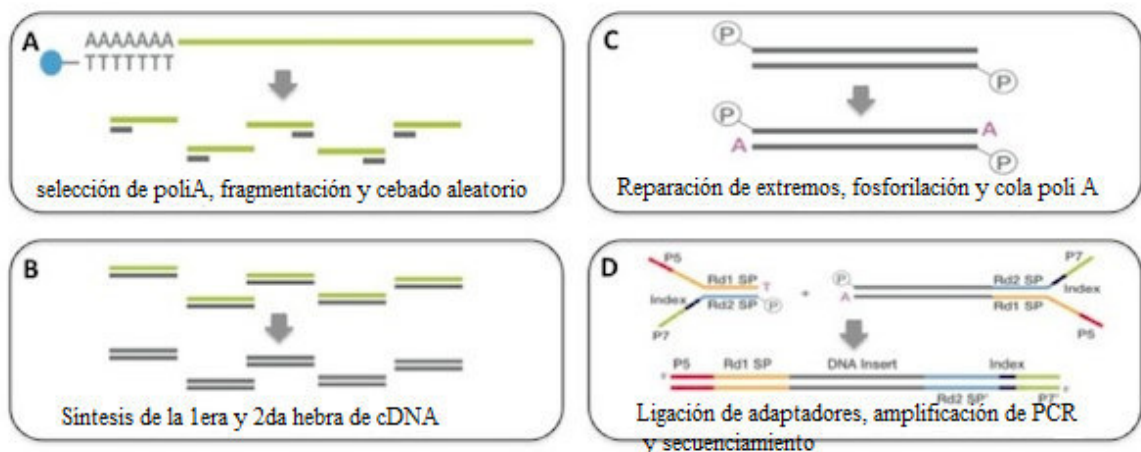


Figura 2. Librería para el ARNseq: La preparación comienza desde 100 ng- 1 µg de ARN total el cual es seleccionado por poli A A) con perlas magnéticas. Doble hebra de ADNc (B) es fosforilada y seguido de A (C) lista para la ligación con el adaptador. La Librería es amplificada por PCR (D) lista para el agrupamiento y secuenciamiento.

Al final de este proceso, el resultado es una secuencia de imágenes. En la cual cada pocillo de luz corresponde a un clúster y el color de cada clúster representa un diferente tipo de base. Para la mayoría de los análisis esto está hecho con las facilidades de secuenciamiento y los usuarios comienzan desde archivos de texto conteniendo las secuencias de nucleótidos para cada clúster. Estos archivos están típicamente en el formato de archivo FASTQ el cual incluye para cada clúster (lectura): un único ID, la secuencia de nucleótido y una medida de calidad Phred por base (Q). Q está definido por $Q = -10\log_{10}(P)$, donde P es la probabilidad de que la llamada base sea incorrecta (Cock *et al.*, 2010). En los experimentos de lecturas de terminaciones pareadas están dos archivos ordenados, uno con la primera terminación y la otra con la segunda.

El alineamiento de lecturas a una referencia la cual puede ser, un genoma o un transcriptoma (el conjunto de todas las secuencias de transcritos de ARN para una especie) se realiza mediante programas bioinformáticos. Actualmente, hay muchos programas de alineamientos capaces de generar uniones de empalme, incluyendo a *Tophat* (Trapnell *et al.*, 2009), GSNAP (Wu & Nacu, 2010), QPALMA (De Bona *et al.*, 2008) y SOAPSplice (Huang *et al.*, 2011), y más alineamientos que están especializados en el alineamiento de lecturas cortas continuamente a una referencia incluyendo *Bowtie* (Langmead & Salzberg, 2012), BWA (Li *et al.*, 2010), y SOAP (Li *et al.*, 2008).

Para el alineamiento con el genoma, uno de los más conocido es el *TopHat* (Trapnell *et al.*, 2012), el cual se basa en una aproximación en la cual las lecturas son inicialmente alineadas de manera continua al genoma con la herramienta *Bowtie* y las lecturas no alineadas son puestas a parte. Cuando las lecturas son mayores a 75 bp, están divididas en pequeños segmentos y alineadas independientemente. Las lecturas que alinean forman un conjunto de regiones cubiertas o islas de expresión. El mapeo de ARNm (contiene una cadena de secuencias de exones concatenados) a un genoma (que contiene los exones e intrones) significa que lee a partir del experimento ARNseq abarcando exones. Por lo tanto, cuando las lecturas del ARNseq son mapeadas al genoma, ellas necesitan ser divididas en dos de manera que los dos extremos de las lecturas mapean a los dos exones con el intrón entre ellos. *Tophat* es considerado un mapeador de empalme rápido, además de alinear, lee a un genoma, adicionalmente representa las fronteras y aparte las divisiones del intrón-exón en un intento de trazar ese

punto entre los límites del intrón-exón (Trapnell et al., 2009). Este puede alinear lecturas ARNseq a genomas muy largos y usa el alineador *Bowtie* de alto rendimiento para lecturas cortas, para el posterior análisis de los resultados de mapeo para identificar uniones de empalme entre exones, hace alineamientos con vacíos lo cual significa que puede acomodar espacios (como inserciones y deleciones) en los alineamientos, así soporta lecturas de extremos pareados y es muy rápida. El formato de las lecturas alineadas de salida por *TopHat* es en el formato de alineamiento de secuencia/ mapa (SAM), este es un formato genérico para almacenar secuencias de nucleótidos alineados. El formato SAM puede ser usado para lecturas simples o pareadas de varios secuenciadores. Los archivos SAM están divididos en dos secciones: el encabezado y el alineamiento. Similar al formato SAM, es el formato de alineamiento binario/mapa (BAM). BAM es una versión binaria comprimida del formato SAM usada para mejorar el rendimiento (Li et al., 2009) (Figura 3).

Para el alineamiento de los transcritos, se utiliza la herramienta *Cufflinks*, la cual usa datos de extremos pareados con el objetivo de identificar nuevos transcritos y probabilísticamente asignar las lecturas, así como analizar promotores y empalmes diferenciales, dos características claves que indican el comportamiento regulatorio con una muestra. Este fue originalmente diseñado para analizar la regulación transcripcional y la regulación del empalme. Así, ensambla transcritos usando lecturas alineadas a la referencia, estima su abundancia, y prueba su expresión diferencial y regulación en muestras de ARNseq (Trapnell et al., 2009). Éste acepta lecturas alineadas de ARNseq y ensambla los alineamientos dentro de un set parsimonioso de transcritos. Luego, *cufflinks* estima las abundancias relativas de estos transcritos basados en cuantas lecturas son compatibles con cada uno, tomando en cuenta sesgos en los protocolos de preparación de la biblioteca. El paquete de herramientas de *cufflinks* contiene un número de diferentes herramientas:

- *Cufflinks*: Toma el archivo de alineamiento de formato SAM desde *TopHat* y ensambla las lecturas mapeadas dentro de los transcritos, proveyendo las coordenadas de los transcritos, incluyendo los exones con los transcritos en relación a su posición en el genoma de referencia. Este también calcula los FPKM) (Fragmentos por Kilobase de exón por millones de fragmentos

mapeados) – un cálculo el cual provee un nivel normalizado de la expresión del gen. FPKM toma en cuenta el número de lecturas secuenciadas durante el experimento, la longitud de los transcritos y el número de lecturas alineadas a ella. Esto permite hacer comparaciones entre los dos sets de datos cuando hay más data en un set de datos que en otro.

- *Cuffmerge*: Provee un archivo integrado de todos los transcritos en cada muestra. Si un transcrito está presente en múltiples muestras, esto es sólo reportado una vez.
- *Cuffdiff*: Encuentra cambios significativos en la expresión de la transcripción, empalme y uso del promotor entre los sets de datos.

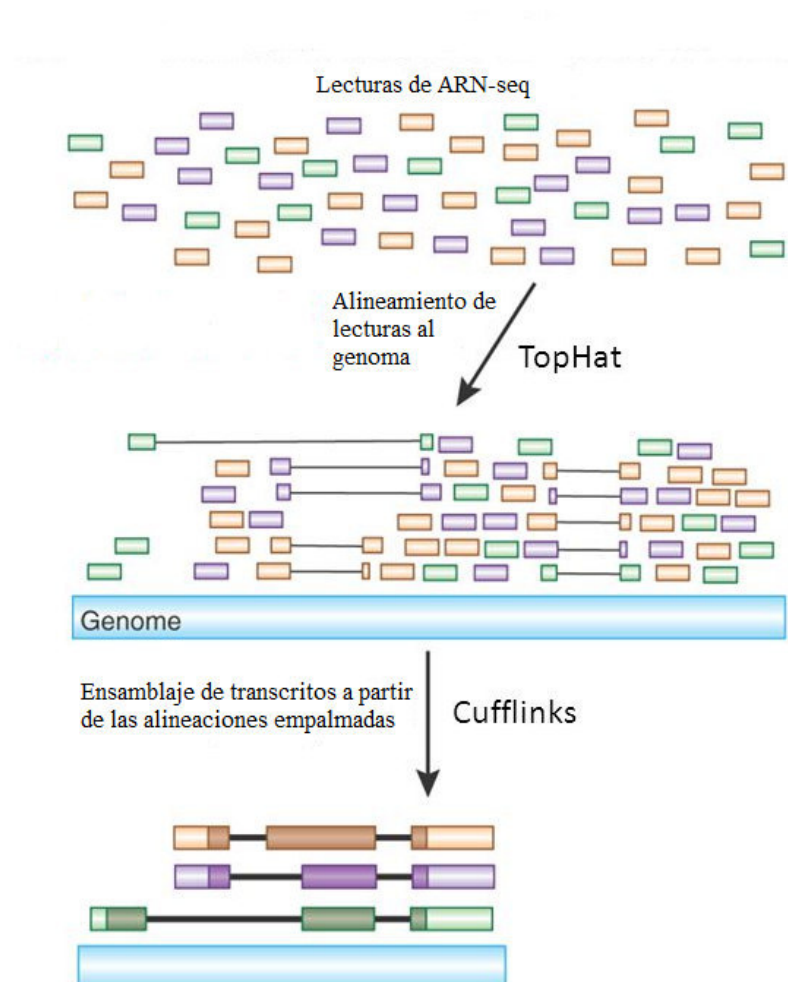


Figura 3. Reconstrucción de transcritos desde lecturas de ARN-seq por alineamiento de los transcritos (*Tophat*) y alineamiento de los transcritos (*cufflinks*).

2.7 Expresión genética

El análisis de los niveles del transcrito ARNm es usado para estudiar la expresión génica en los organismos. Uno de los procedimientos más ampliamente adoptados involucra la transcripción reversa de la PCR, donde el material genético base en la reacción de PCR es el ARN, donde el ARN es transcrito primero en ADN complementario (ADNc) por una enzima de transcriptasa reversa. El ADNc es amplificado como un PCR tradicional, y mediante electroforesis en agarosa se verá si el producto del gen ha amplificado. Siendo los resultados leídos como presencia y ausencia del gen. El principal inconveniente es el análisis de amplicones en la última fase de la amplificación del PCR (nivel de meseta). Y, por lo tanto, el análisis de expresión génica es sólo semi cuantitativo. En la década de los 90s, la tecnología del PCR en tiempo real, la transcripción reversa de la reacción cuantitativa de la cadena de la polimerasa (RT-qPCR), usando colorantes fluorescentes permitió los procesos de amplificación y detección de un gen blanco para ser monitoreado en tiempo real. La ventaja de esta técnica es que la cinética de la reacción es medida en la fase temprana exponencial de la PCR. Y esto permite alta sensibilidad, reproducibilidad, un amplio rango de cuantificación (Condori *et al.*, 2011) y precisión (Vermeulen *et al.*, 2011). Además, permite la detección y a la vez cuantificación de patógenos de plantas (Grosdidier *et al.*, 2016). Adicionalmente, diversos métodos de detección microbiológica basados en RT-qPCR proveen una alta sensibilidad y poca variabilidad comparada con técnicas que necesitan cultivo. Así también, se ha reportado la aplicación de RT-qPCR para la detección de una sola espora de hongo (Llorente *et al.*, 2010). La técnica de RT-qPCR necesita un reportero fluorescente que se une al producto formado y refleja su cantidad mediante fluorescencia (Kubista *et al.*, 2006). Entre todas las tecnologías disponibles de detección de químicos, Taqman y Sybr Green son los más usados. Este último, tiene un costo bajo de corrida y provee buena sensibilidad y especificidad. A gran escala y para rutina es recomendado (Llorente *et al.*, 2010).

Las reacciones son caracterizadas por el punto en el tiempo donde la amplificación del blanco es detectada primero. Esta medida es usualmente referida como un ciclo umbral (C_t), el tiempo al cual la intensidad de la fluorescencia es mayor que la fluorescencia basal (Wong & Medrano, 2005).

Cuando cuantificamos ARNm, la técnica de PCR en tiempo real puede ser realizada en un paso, o dos pasos de reacción. El protocolo de dos pasos puede ser el preferido cuando usamos un colorante de unión al ADN (como el SYBR Green), por lo que es fácil eliminar la manipulación de dímeros de cebadores a través de la manipulación de las temperaturas de anillamiento (T_a) (Wong & Medrano, 2005).

Existen dos tipos de cuantificación: Absoluta y Relativa. En la primera, usando el método de la curva estándar, se puede cuantificar desconocidas muestras basado en cantidades conocidas mediante la extrapolación. En la expresión relativa, cambios en la expresión del gen son medidas basados en un estándar externo o una muestra de referencia. Existen varios modelos matemáticos para calcular la media de la expresión del gen normalizado de los ensayos de cuantificación relativa. Uno de ellos, es el modelo Pfaffl. El cual combina la cuantificación del gen y normalización dentro de un simple cálculo. Este modelo incorpora las eficiencias de la amplificación de los genes blancos y de referencia para corregir las diferencias entre dos ensayos (Wong & Medrano, 2005).

La eficiencia del ensayo del PCR puede ser estimado desde una curva estándar basado en diluciones seriadas. Las medidas de C_t son ploteadas versus el logaritmo de las concentraciones de las muestras (Kubista et al., 2006).

2.8 Set de diferenciales

Un set de diferenciales es un grupo de genotipos conteniendo genes específicos de resistencia. El set diferencial para TT conteniendo los genes *R1-R11* (Black et al., 1953), que fueron introgresados en papa desde *Solanum demissum* (Mastenbroek, 1952) fueron creados para poder caracterizar el espectro de virulencia y monitorear la dinámica de la virulencia en una población de *P. infestans* (Cooke & Lees, 2004). La virulencia está definida basada en la interacción con el patógeno y las plantas en el set. Así la virulencia de cada gen introducido se encontró rápidamente y razas complejas con 9-11 genes de virulencia se han identificado en varias oportunidades (Shattock et al., 1977; Turkensteen, 1993; Andrivon, 1994). Así, por ejemplo, un set diferencial de genotipo con el gen *R1* reconoce una cepa de *P. infestans* específica, se asume que la cepa tiene el gen *Avr1* (Peters et al., 1998).

Es importante resaltar que el actual aumento de los genes *R* implica también una mayor variabilidad del patógeno con respecto al número de factores de virulencia que se podría encontrar en las razas (Miranda *et al.*, 2005).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

La variabilidad alélica y la expresión de genes efectores de avirulencia *P. infestans* determinan la funcionabilidad de la resistencia transgénica.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo general:

Determinar la diversidad de los genes efectores *Avr-blb1*, *Avr-vnt1* y *Avr-blb2* en las cepas peruanas de *P. infestans* y relacionar su variabilidad con la reacción de resistencia durante la interacción planta patógeno

3.2.2 Objetivos Específicos:

- a) Cuantificar la expresión de genes efectores en cepas peruanas pertenecientes al linaje clonal EC-1 de *P. infestans*.
- b) Evaluar la variación alélica en los genes efectores en cepas peruanas pertenecientes al linaje clonal EC-1 de *P. infestans*.
- c) Evaluar el fenotipo de interacción de las cepas de *P. infestans* con la planta transgénica Desiree [*Rpi-vnt1*].

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Evaluación de genes de avirulencia en cepas peruanas pertenecientes al linaje clonal EC-1 de *P. infestans*.

4.1.1 Cepas de *P. infestans*

En total cinco cepas peruanas (POX067, POX109, POX096, POX106 y POX110) fueron estudiadas en el presente estudio, las cuales tienen diferentes patrones de virulencia determinados por el set diferencial de papa (Tabla 1). Estas fueron inoculadas en las hojas de la variedad de papa susceptible “Yungay” (CIP 720064) y en el clon resistente “LBr40” (CIP 387164.4).

Las plantas tuvieron 45 días de crecimiento. Las condiciones en que se mantuvieron fueron: La concentración de la inoculación fue de 3000 esporangios/mL; cada planta (4 plantas/ genotipo/ cepa) fue inoculada por rociamiento. Las condiciones en las que las plantas fueron mantenidas fueron por vapor frío a través de un sistema de aspersión que opera en un termostato en una cámara de frío con luz artificial. La temperatura estuvo en un rango de 15-20 °C y con un régimen de luz de 12 h. Las evaluaciones del TT comenzaron tres días posteriores a la inoculación (dpi). Cada planta fue evaluada en su estado de la enfermedad (porcentaje de área foliar afectada). La evaluación fenotípica fue realizada en la escala de 0-100 % con cinco unidades de intervalo donde 0: indica reacción no visible, 5: reacción hipersensible y de 10-100: infección exitosa.

Tabla 1. Características de cepas de *P. infestans* basadas en pruebas de infección usando el set diferencial de 11 genes *Rpi* de *S. demissum*

Cepa	Variedad del Hospedero	Localización	Fecha de colecta	Virulencia en set diferencial de genes <i>Rpi</i> de <i>S. demissum</i>	Gen de Avirulencia
POX067	Yungay		14/11/2000	<i>R1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11</i>	Avr 8,9
POX096	Amarilis		21/02/2000	<i>R1, 3, 4, 7, 8, 10, 11</i>	Avr 2,5,6,9
POX106	Yungay	Pasco, Oxapampa	23/02/2005	<i>R1, 3, 4, 7, 10, 11</i>	Avr 2,5,6,8,9
POX109	LBr-40		14/04/2005	<i>R1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11</i>	Avr 5
POX110	LBr-40		22/03/2005	<i>R1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11</i>	Avr 5

4.1.2 Muestreo y procesamiento de las muestras

Se muestreó a los 1, 2 y 3 dpi, dos muestras consistieron en 4 folíolos para cada uno, fueron colectadas de la parte media de las plantas para cada genotipo. Las dos muestras fueron consideradas repeticiones biológicas, siendo en total seis muestras colectadas de cada interacción entre genotipo de papa y cepa de *P. infestans*. Los folíolos fueron colectados en N₂ líquido y almacenados a -70 °C. Las muestras fueron trituradas con N₂ líquido y entre 50-100 mg fueron utilizados en cada microtubo con el reactivo Trizol (Invitrogen®). El ARN fue tratado con ADNasa (Ambion® TURBO DNA-free™). El ARN extraído de cada día y de cada repetición biológica, fue cuantificado en Nanodrop (Invitrogen®), en un tubo fue juntado un “mix” de todos de manera equitativa para el secuenciamiento del transcriptoma. Las muestras secuenciadas fueron los folíolos inoculados con las cepas POX067 y POX109, luego de conocer sus resultados fenotípicos. El secuenciamiento del transcriptoma fue realizado por Fasteris Genomics®, y fue corrido en un

equipo Illumina HiSeq2000, generando lecturas pareadas de 2x100 pb. La data del secuenciamiento fue registrada en el Archivo de lecturas de secuencias del NCBI [número de acceso SRP065209].

4.1.3 Evaluación de la expresión de genes de avirulencia de *P. infestans* mediante ARNseq

Se realizó acorde a Trapnell et al. (2012). Las lecturas de ARNseq de las dos librerías fueron mapeadas contra el genoma de referencia de *P. infestans* ASM14294v1.25 usando las aplicaciones bioinformáticas de *TopHat* v2.1.0 y *Bowtie 2* v2.1.0 (Langmead & Salzberg, 2012). Los genes expresados y transcritos fueron ensamblados. Los genes diferencialmente expresados fueron identificados usando la aplicación bioinformática *Cufflinks* v2.1.1. *CummeRbund* fue usado para visualizar los resultados. Las llamadas variantes de los archivos Bam producidos por el *Bowtie 2* fueron hechas con la ayuda de las herramientas del SAM y del BCF.

4.1.4 Evaluación de la variabilidad alélica de los genes de avirulencia

La siguiente información también fue útil para la identificación de los SNPs de los genes de interés: Todas las lecturas que mapearon las regiones “supercontigs” de interés correspondiente a los genes *Avr-blb1*, *Avr-vnt1* y *Avr-blb2* fueron extraídas de los archivos SAM usando comandos de Linux convencionales. Las lecturas fueron ensambladas y los SNPs fueron identificados usando DNASTar Laser Gene 12 SeqmanPro. La cobertura mínima fue fijada a 30 y la frecuencia de ocurrencia al mínimo de 5%. En el caso de *Avr-blb1*, el árbol filogenético *NeighborJoining* fue construido usando Mega v 6.06[®] usando secuencias de las variantes de *lpiO* depositados en NCBI para comparar los resultados (*lpiO1*: L23939.1, *lpiO2*: L23938.1, *lpiO3*: GQ371190.1, *lpiO4*: GQ371191.1, *lpiO5*: GQ371192.1, *lpiO6*: GQ371193.1, *lpiO8*: GQ371195.1, *lpiO9*: GQ371196.1, *lpiO10*: GQ371197.1, *lpiO11*: GQ371198.1).

En el caso de *Avr-blb2*, los SNPs fueron reanalizados por secuenciamiento

amplicones de las dos cepas, empleando cebadores que flanqueaban la posición 69 de interés (Oh et al., 2009). Las muestras fueron enviadas a Macrogen®, utilizando el vector PCR2.1 (Invitrogen®), siendo consideradas entre 45 a 60 colonias para el secuenciamiento.

4.1.5 Validación de la expresión génica diferencial por RT-PCR

La transcripción reversa de la reacción de la cadena de la polimerasa (RT-PCR) se realizó para los genes *Avr-blb1* (*ipiO1*, *ipiO2*, *ipiO3*, *ipiO4*), *Avr-vnt1*, *ef2α* (control constitutivo de *P. infestans*) y *Avr3a* (control de virulencia) (Pel, 2010; Robideau et al., 2011) en dos pasos: La primera hebra de ADNc sintetizada usando 1 µg de ARN total y oligo dT (SuperScriptIII-Invitrogen®), como es descrito por el fabricante. La segunda hebra con *Taq*-polimerasa en un volumen final de reacción de 10 µl usando para los pares de cebadores de *Avr-vnt1SP*, *Avr3a* y *ef2α* (Tabla 2): 1 µl de ADNc con 0.2 µM de cada cebador, 0.2 µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1X de tampón de PCR y 1 unidad de Platinum *taq* (Invitrogen®). Y para *Avr-blb1* (Tabla 2): 2 µl de ADNc, 0.4 µM de cada cebador, 0.025 mM de dNTPs, 0.83 mM de MgCl₂, 1X tampón de PCR y 1 unidad de Platinum *Taq* (Invitrogen®). El siguiente programa de PCR fue utilizado para *Avr-vnt1SP* y *Avr3a*: 94 °C por 3 mins, 94 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg, durante 35 ciclos, 72 °C por 5 mins. Para *ef2α*: 95 °C por 4 mins, fase *touch down*: 95 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg, 72 °C por 15 seg, durante 10 ciclos (disminuyendo la temperatura un grado por cada ciclo), luego 95 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg, 72 °C por 15 seg durante 20 ciclos y 72 °C por 2 mins. Y para *Avr-blb1* cebadores: 95 °C por 2 min, 95 °C por 30 seg, T °C anillamiento por 30 seg, 72 °C por 45 seg durante 32 ciclos, y 72 °C por 45 seg. Para el caso de *Ipio4*, la confirmación de bandas ténues se realizó mediante secuenciamiento.

4.1.6 Validación de la expresión diferencial por qRT-PCR

La qRT-PCR, se realizó usando el power SYBR green super mix (real time PCR kit Invitrogen®) realizado con ADNc sintetizado con el Kit superscript III First-Strand (Invitrogen®) según condiciones del fabricante. Amplificación de gen de elongación (*ef2α*) será utilizado como control constitutivo para *P. infestans* (Pel, 2010). Se tomó en cuenta la variable C_t , que es inversamente proporcional a la cantidad de ADN inicial. Se estudió la variabilidad en la cuantificación de la expresión en los tres días, en las diferentes cepas de *P. infestans*, en los diferentes genes. El siguiente programa de PCR fue utilizado: 95°C por 3 mins, 95°C por 15 seg y T_a (°C) por 45 seg durante 40 ciclos, 95°C por 1 min, 65°C por 1 min y 65°C por 10 seg (análisis de la curva de fusión). Se trabajó con tres repeticiones experimentales. Los cebadores fueron diseñados sobre las secuencias PITG de los genes identificados (Tabla 2) con la aplicación Primerquest en Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com>). Teniendo en cuenta condiciones básicas necesarias (Dieffenbach *et al.*, 1993). La expresión relativa de los genes de avirulencia fueron normalizados con el gen *ef2α* con el programa REST® (<http://rest.gene-quantification.info/>).

Las eficiencias del qRT-PCR para cada cebador diseñado fueron obtenidas por curvas de diferentes diluciones, calculándolo acorde a (Llorente et al. (2010); Pfaffl (2001)) .

Las diferencias significativas fueron determinadas por la prueba de comparación múltiple de Tukey usando el programa SAS 9.1.3. La data fue analizada con una repetición biológica de cada muestra colectada.

4.2 Evaluación del fenotipo de interacción las cepas de *P. infestans* con la planta transgénica Desiree [*Rpi-vnt1.1*].

4.2.1 Inoculación y evaluación de la enfermedad

Las plantas de tubérculo cultivados de los eventos transgénicos de “Desiree” conteniendo el gen *Rpi-vnt1.1* (eventos: 6, 2, 3, 13, 22 y 55) y de plantas controles: 1 resistente y 2 susceptibles “LBr40”, “Yungay” y “Desiree” respectivamente, fueron inoculados con las cepas POX067 y POX109. Las plantas fueron aproximadamente de 45 días de cultivo y la concentración del inóculo fue de 3,000 esporangios / ml. Cada planta (4 plantas/genotipo/cepa) fue inoculada por “spray”. Luego de esto, fue cubierto con bolsa plástica para mantener la humedad. Este experimento tuvo lugar en un invernadero en condiciones de bioseguridad y bajo el régimen de luz natural de aproximadamente 12 h de luz. La temperatura fue en el rango de 15-25 °C, y las evaluaciones fenotípicas fueron tomadas según lo escrito previamente en el punto 4.1.1.

4.2.2 Muestreo y procesamiento de las muestras

Las muestras colectadas fueron al 2 y 3 dpi sacando una muestra por día. El ARN extraído en este caso, fue procesado de la siguiente manera: Foliolos en N₂ líquido fueron trituradas para la extracción con Trizol (Invitrogen®) con una repetición experimental. Tratamiento de ADNasa fue realizado (Ambion® TURBO DNA-free™).

4.2.3 Evaluación de la expresión génica por RT-PCR

Luego, RT-PCR cualitativo se realizó con los cebadores *Avr-vnt1*, *ef2alpha* y *Avr3a* según como es detallado en el punto 4.1.5.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores de PCR utilizados en qRT-PCR y RT-PCR

Método	Gen	Secuencia de cebador sentido (5'-3')	Secuencia de cebador antisentido (5'-3')	Ta (°C)	Amplicón (pb)	Referencia
qRT-PCR	<i>PITG_16294</i>	GGCTGAACGATGCCTTAA	TACCAGTCATCTGCGTACTT	54	100	*
	<i>PITG_17400</i>	CGGTGGTATGGATGGAATG	CTGTGGAGTGGAAAGAGAAG	54	98	*
	<i>PITG_11584</i>	GGCGTACTTCGCATTCT	AAC TGCTCGCGGATTTC	58	107	*
	<i>PITG_04085</i>	TCGCAGCATTCCTCAATC	GCCGCTCTGAATAACTTCT	60	110	*
	<i>PITG_21388</i>	TGCGGAATACGTGAAGATG	CGGATTATAGAGAGCCGTAAA	52	116	*
	<i>PITG_14371</i>	ATGTGGCTGCGTTGACGGAGA	TTTGCGCCTTGCGTCTTGCG	60	169	*
qRT-PCR	<i>PITG_22089</i>	ATCACTCCTCGTCCACTC	TCCTCGCTCTTCCATACTT	54	97	*
	<i>ef2α</i>	GTCATTGCCACCTACTTC	CATCATCTTGTCCTCAGC	60	162	(Pel, 2010)
RT-PCR	<i>PITG_14371</i>	ATGTGGCTGCGTTGACGGAGA	TTTGCGCCTTGCGTCTTGCG	60	169	(Pel, 2010), *
RT-PCR	<i>Avr-vnt1SP</i>	GTAACGACCCCGACCAAGTT	TCAAGCTCTAATAGGATCAAGC	60	393	(Pel, 2010)
	<i>ipiO1</i>	TGAGTACAACGCCGATGAAA	AGATGCTTGGTCTTAGGATTCT	61	300	
	<i>ipiO2</i>	CGCATCGATGGTTTCATCCAATCTCA	TTTGAATCTGTTGAAAAATACGTTAC	58	390	(Halterman et al., 2010)
	<i>ipiO3</i>	CGCATCGATGGTTTCATCCAATCTCA	GCTAGCGGAAGCCCTTATCGATATA	62	370	(Halterman et al., 2010)
	<i>ipiO4</i>	CAACACCGCCGGGCATG	CAACACCGTCTTGGAAGTCTGAG	62	230	

V. RESULTADOS

5.1 Evaluación de genes de avirulencia, en cepas peruanas pertenecientes al linaje clonal EC-1 de *P. infestans*

5.1.1 Evaluación Fenotípica

Los síntomas típicos del TT aparecieron en las plantas a los 2 dpi. La primera evaluación fue realizada a los 3 dpi, cuando la RH fue visible en el genotipo más resistente “LBr40” con todas las cepas. En la evaluación final a los 5 dpi, la planta susceptible “Yungay” fue infectada en el rango del 90-100% dependiendo de la cepa. Las cepas POX109 y POX067 tuvieron diferentes respuestas de agresividad en la virulencia, la primera tuvo la capacidad de infectar el genotipo más resistente “LBr40”, en cambio el segundo mostró poca agresividad (Figura 4). Debido a esto, estas dos cepas fueron seleccionadas para el secuenciamiento del transcriptoma (ARNseq).

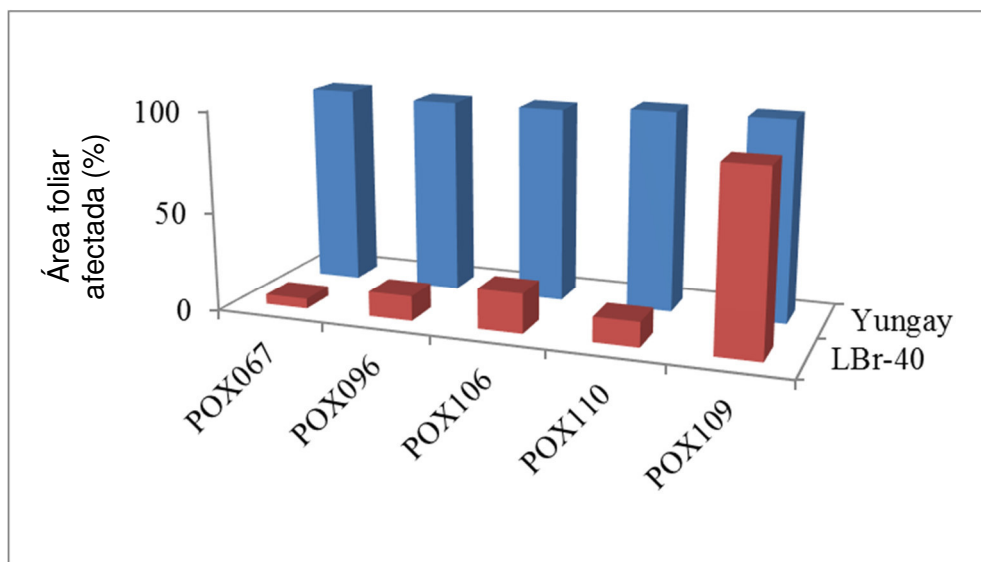


Figura 4. Agresividad de las cepas de *P. infestans* POX067, POX096, POX106, POX110 y POX109 en los genotipos Yungay y LBr40 de la papa en la cámara de frío. La incidencia de la enfermedad está mostrada como el porcentaje (%) de área foliar afectada a los 5 dpi.

5.1.2 Procesamiento de las muestras

Debido a las diferencias de respuesta fenotípica en la muestra resistente “Lbr40” (Figura 5), las muestras que fueron escogidas para el secuenciamiento del transcriptoma fueron aquellas inoculadas con POX067 y POX109 en la variedad susceptible “Yungay” para tener la mayor expresión de genes de virulencia de *P. infestans*. En la Figura 4 se muestra su análisis de calidad de ARN purificado. Además, también se procesaron las muestras inoculadas con las cepas POX096, POX106 y POX110 (Figura 6).

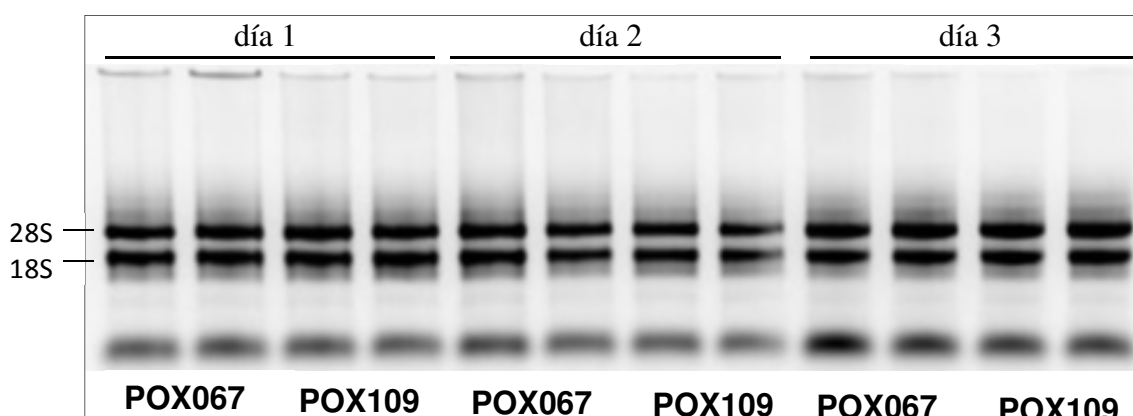


Figura 5. Extracción de ARN ribosomal de muestras de folíolos Yungay inoculados con POX067 y POX109, en los 1, 2 y 3 dpi, mostrando una repetición biológica de izquierda a derecha.

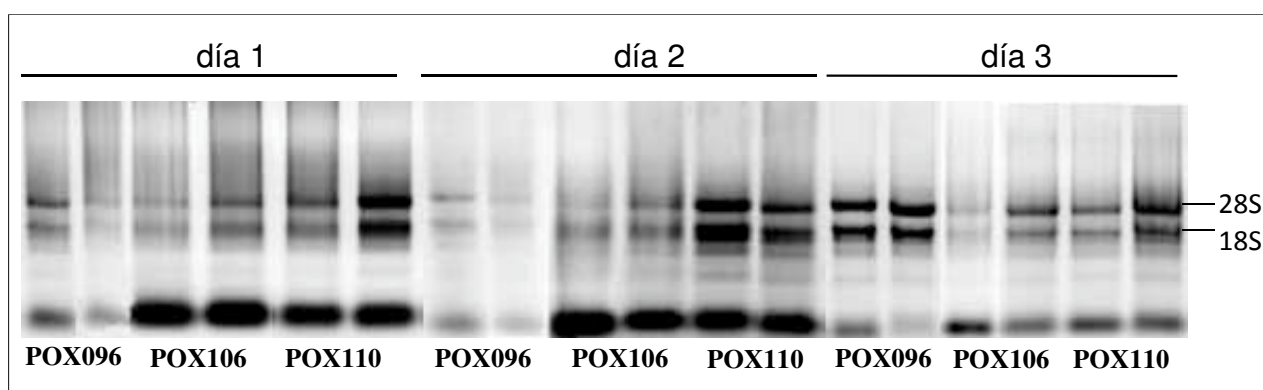


Figura 6. Extracción de ARN ribosomal de muestras de folíolos Yungay inoculados con POX096, POX106 y POX110, en los 1, 2 y 3 dpi, mostrando una repetición biológica de izquierda a derecha.

5.1.3 Expresión de genes de avirulencia de *P. infestans*

Como se esperaba, la mayoría de los transcritos fueron de origen vegetal y sólo una fracción corresponde al genoma de referencia de *P. infestans* (Tabla 3). Gracias a la herramienta CummeRbund se pudo evaluar el patrón de expresión de genes a través del eje longitudinal, representados por el área bajo la curva (Figura 7). La expresión por regiones fue subsecuentemente calculada por Fragmentos por Kilobase de transcrito por millones de lecturas Mapeadas (FPKM), el cual mide la concentración molar de un transcrito por conteos de lectura normalizada a la longitud del ARNm respectivo y al número total de lecturas de cada muestra. Al mismo tiempo en la Figura 8 se muestran las similitudes de expresión de genes entre las dos cepas (POX067 y POX109), expresándose en ambas la mayoría de genes.

Acorde al análisis de *cuffdiff*, hubo 23 genes PITG que fueron diferencialmente expresados entre las dos cepas. De estos, 15 fueron silenciados en POX067 y 4 fueron silenciados en POX109 (Anexo 1). Sin embargo, en muchos casos el nivel de expresión fue extremadamente bajo en las cepas no silenciadas, sugiriendo que las diferencias pueden no ser reales y además una examinación detallada mostró solo cobertura parcial de la función del gen y por lo tanto estos genes no fueron considerados como diferencialmente expresados. Luego de filtrar resultados no fidedignos fueron 8 genes con expresión diferencial significativa entre las dos cepas. Cuatro genes fueron del tipo de efectores RXLR y cuatro fueron anotados como proteínas hipotéticas. Los efectores RXLR conocidos corresponden a los genes *Avr-vnt1*, *Avh 9.1* y dos tipos de genes RXLR desconocidos (PITG_04169, PITG_22675) (Tabla 4 y Figura 9). Además de los genes que fueron significativamente diferenciales en su expresión en la Tabla 4 se han añadido los genes *Avr-blb1*, *Avr-blb2* y *Avr-3a* que por su posterior análisis de SNPs es importante conocer su valor de expresión.

Tabla 3. Estadísticas de mapeo de dos bibliotecas de ARNseq alineadas al genoma de referencia de *P. infestans* usando Bowtie 2.

	Biblioteca: POX067	Biblioteca: POX109
Número de lecturas	100,522,018	86,279,262
% Filtro aprobado (FA)	90.42	91.79
% de bases (FA) Q ≥ 30	90.15	90.68
Lecturas izquierdas mapeadas al genoma de referencia	931,054 (0.9%)	2,899,272 (3.4%)
Lecturas derechas mapeadas al genoma de referencia	897,227 (0.9%)	2,819,585 (3.3%)
Lecturas izquierdas con múltiples alineamientos	223,369 (24.0%)	489,606 (16.9%)
Lecturas derechas con múltiples alineamientos	214,938 (24.0%)	477,948 (17.0%)
Pares alineados	788,620	2,625,801
Pares alineados con múltiples alineamientos	130,876 (16.6%)	367,809 (14%)

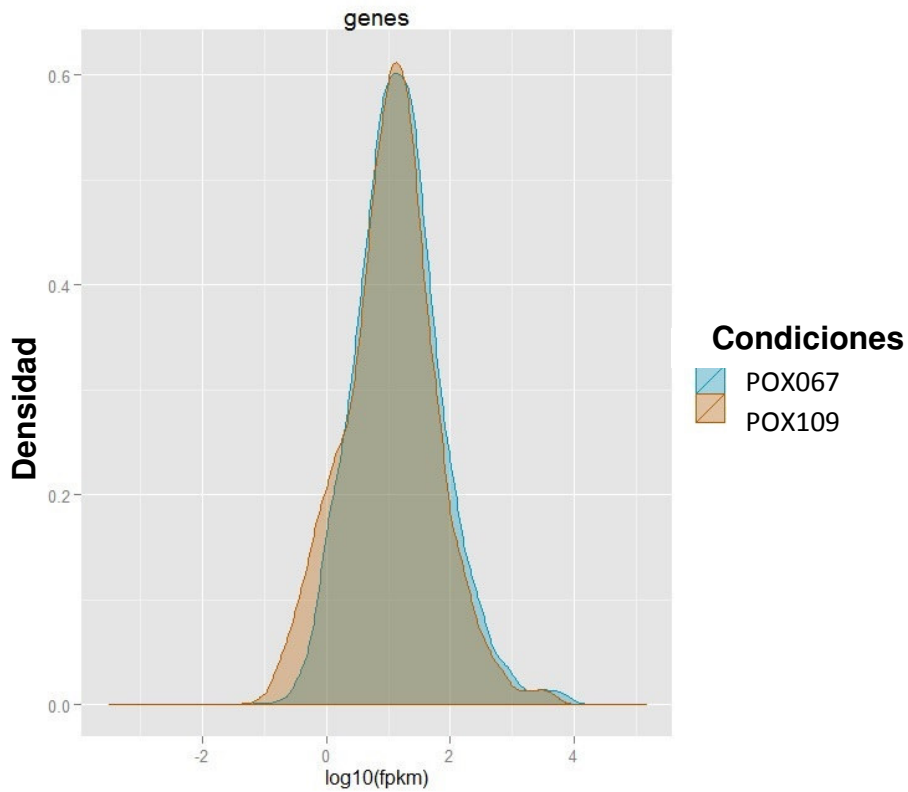


Figura 7. Distribución de los niveles de expresión, según CummeRbund, para todos los genes en condiciones experimentales simuladas POX067 y POX109. FPKM: Fragmentos por kilobase de transcrito por millón de lecturas mapeadas.

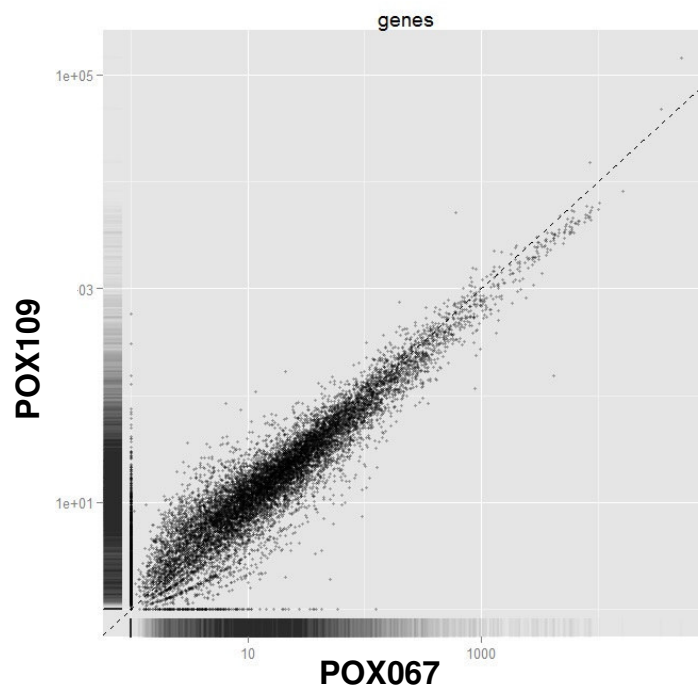


Figura 8. Similitudes generales y diferencias específicas entre condiciones POX067y POX109 según CummeRbund.

Tabla 4. Expresión de genes PITG entre las dos cepas acorde a cuffdiff.
*Analizados con qRT-PCR.

gen	Anotación	FPKM		p-value	Diferencia significativa
		POX067	POX109		
PITG_22089	<i>Avh9.1</i> *	0	126.53	5.00E-05	Si
PITG_05912		0	0		
PITG_05918		0	0		
PITG_05911		0	69.42	5.00E-05	
PITG_16294	<i>Avr-vnt1</i> *	35.1	0	5.00E-05	Si
PITG_22547		35.65	0	5.00E-05	
PITG_21388	<i>lpiO1</i> *	2791.44	1073.36	8.57E-02	No
PITG_14371	<i>Avr3a</i> *	1195.12	580.91	8.34E-02	No
PITG_14374		0	0		
PITG_14368		0	0		
PITG_04085	<i>Avr-blb2</i> *	0	0		No
PITG_20300		349.19	139.08	3.27E-01	
PITG_20301		17.7	19.99	8.85E-01	
PITG_20303		189.12	145.71	5.50E-01	
PITG_04086		0	0		
PITG_04090		1826.55	722.33	1.72E-02	
PITG_18683		1491.41	803.66	9.25E-02	
PITG_04169	RXLR	0	38.85	5.00E-05	Si
PITG_04167		0	0		
PITG_22675	RXLR	37.42	0	5.00E-05	Si
PITG_17400	proteína hipotética*	126.33	20.17	5.00E-05	Si
PITG_11584	proteína hipotética*	109.94	15.87	1.50E-04	Si
PITG_11572		43.46	6.03	0.008	
PITG_09128	proteína hipotética	41.49	0	1.50E-04	Si
PITG_09130		0	0		
PITG_07492		0	0		
PITG_00149	proteína hipotética	6.8	29.43	2.00E-04	Si

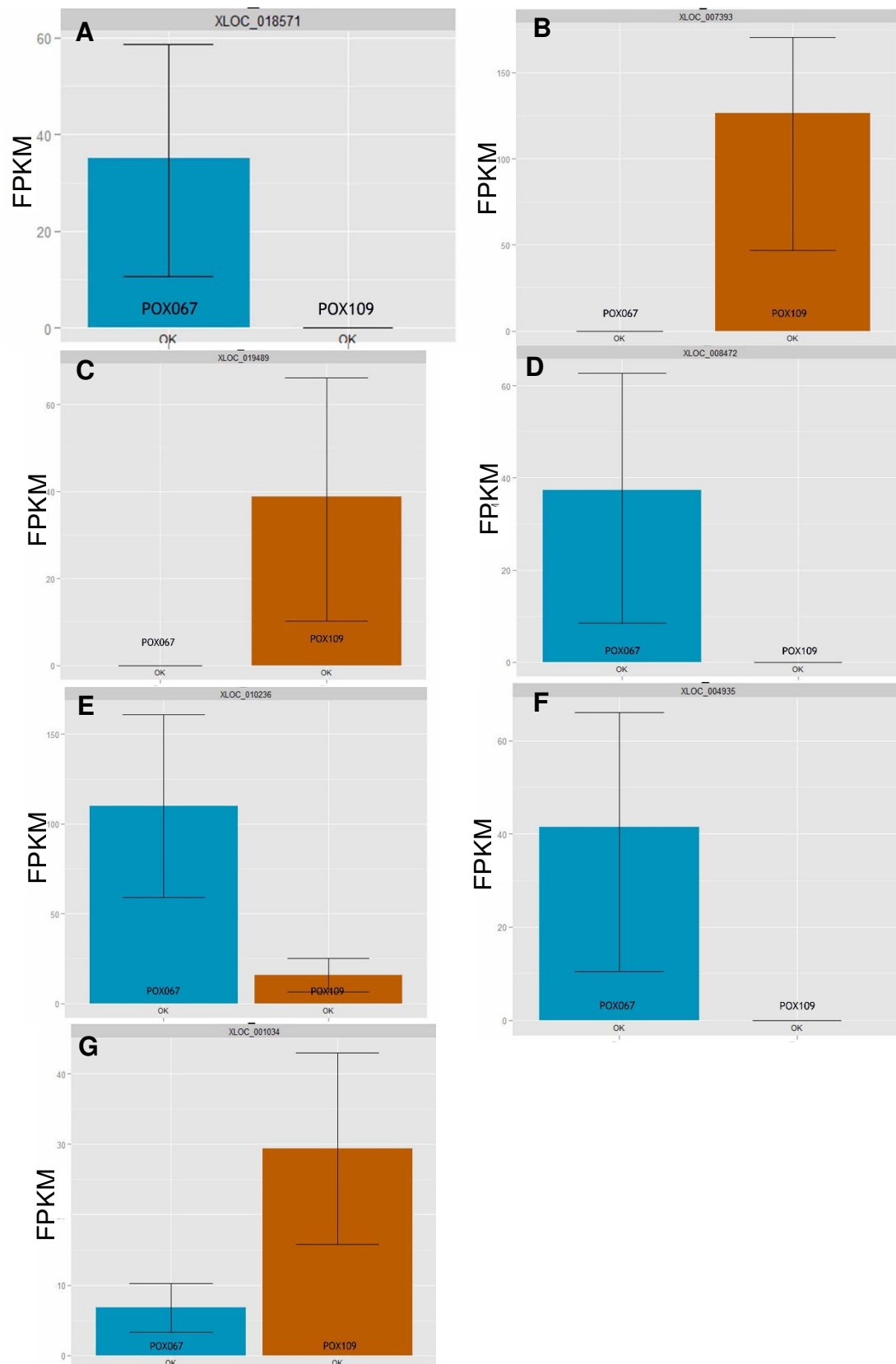


Figura 9. Análisis significativo de la expresión diferencial de genes: A) PITG_16294, B) PITG_22089, C) PITG_04169, D) PITG_22675, E) PITG_11584, F) PITG_09128 y G) PITG_00149, entre las dos condiciones POX067 y POX109. FPKM: fragmentos por kilobase de transcrito por millón de lecturas mapeadas.

5.1.4 Evaluación de la variabilidad alélica de los genes de avirulencia de *P. infestans*

- Variantes *Avr-blb1*

Las lecturas que mapean a la región *supercontig* 1.302:59521-59980 albergan el gen *Avr-blb1* fueron extraídos desde los archivos SAM luego del mapeo. En POX109, 2467 lecturas fueron ensambladas a un contig. Sólo la clase I, de variantes *IpiO* son expresadas en la cepa POX067, no todos los SNPs característicos de las otras clases de variantes fueron detectados. Por otro lado, POX109 es probable que también exprese la variante de la clase II además de las variantes dominantes de la clase I (Tabla 5). SNPs característicos a la variante de la clase III no fueron encontrados en los contigs de ninguna de las muestras (Figura 10).

Tabla 5. Reporte de SNPs en las lecturas alineadas a *Avr-blb1* (PITG_21388) y *Avr-blb2* (PITG_04085).

	Posición	Mayo- ría	Alterna- tiva	SNPs (%)		Recuento de Alternativa	
				POX109	POX067	POX109	POX067
<i>Avr-blb1</i> (PITG_21388)	313	C	T ¹	465 (13)		62	
	365	G	T ²	353 (14)		51	
	382	C	T ³	341 (6)		20	
	401	C	G ⁴	337 (20)	216 (13)	68	28
	429	A	C ⁵	330 (12)	209 (19)	39	39
<i>Avr-blb2</i> (PITG_04085)	207	C	T	2475 (23)	1115 (16)	560	179
	209	A	C	2470 (23)	1118 (18)	557	197

¹ SNP nueva.

² Variante encontrada en: *IPI-O11*, *IPI-O10*, *IPI-O8*, *IPI-O6*, *IPI-O5*.

³ Variante encontrada en: *IPI-O3*.

⁴ Variante encontrada en: *IPI-O11*, *IPI-O10*, *IPI-O9*.

⁵ Variante encontrada en: *IPI-O10*, *IPI-O9*, *IPI-O8*, *IPI-O6*, *IPI-O5*, *IPI-O4*, *IPI-O3*.

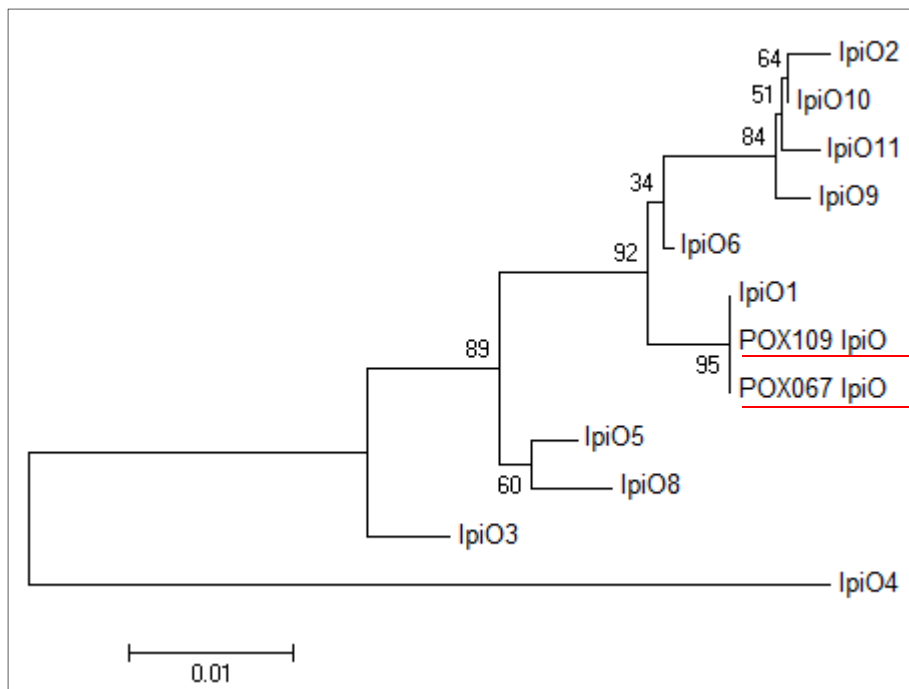


Figura 10. Árbol filogenético Neighbor-Joining basado en las secuencias de las variantes IPI-O y las secuencias consenso de las lecturas de las muestras Yungay-POX067 y Yungay-POX109 mapeadas a las secuencias tipo IPI-O.

- Variantes *Avr-blb2*

Todas las lecturas mapeadas a las regiones *supercontigs* 1.5, 1.125, y 1.79 que albergan genes de la familia de *Avr-blb2* fueron ensambladas para ambas cepas. En POX067, 5942 lecturas y en POX109 14288 lecturas fueron ensambladas a un solo *contig*. En total 23 SNPs fueron identificados en ambas cepas, de los cuales 7 fueron nuevos (no mostrado). Centrándonos en el SNP del AA69 que determina la especificidad de reconocimiento del gen de Resistencia *Rpi-blb2*, ambas variantes Ala69 y Phe69 fueron encontradas en ambos aislamientos, el primero mencionado fue el más frecuente (Tabla 5 y Figura 11). Como Ala 69 estuvo presente en ambas cepas es esperado que sea avirulento en el gen *Rpi-blb2*.

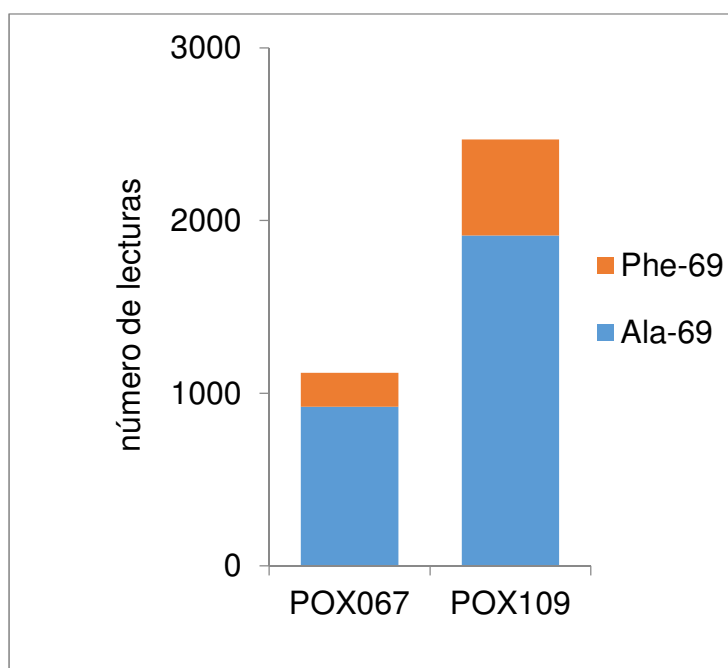


Figura 11. Variantes alélicas de *Avr-blb2*. Números de lecturas que abarcan el SNP del aa69 que es crucial para el reconocimiento por *Rpi-blb2*.

Los resultados del secuenciamiento por PCR y clonamiento dieron las variantes para la posición 69 de aminoácidos en el caso de POX109 (47 colonias) fueron Ala, Val y Phe, y para POX067 (53 colonias) fueron Ala, Val, Ile y Phe (Figura 12).



Figura 12. Variantes alélicas de *Avr-blb2* en la posición 69 vía PCR seguido por clonamiento y secuenciamiento de las cepas POX067 y POX109 es representado por el rectángulo color verde. “n”: Representa los números de colonias transformantes que se obtuvieron para cada cepa.

- Variantes *Avr-vnt1*

Desde que sólo POX067 expresó *Avr-vnt1* se pudo analizar las variantes alélicas para el gen desde lecturas del ARNseq para esta cepa. Sólo una variante de *Avr-vnt1* fue encontrada. Esto difiere del gen PITG_16294 por una sustitución sinónima en la posición 321 y del gen PITG_22547 por otra sustitución sinónima en la posición 327 (Figura 13).



Figura 13. Alineamiento de secuencia de ADN de las variantes de *Avr-vnt1* en POX067 (PITG_16294 y PITG_22547).

5.1.5 Validación de la expresión diferencial por RT-PCR

Avr-blb1

Cuando se realizó el análisis mediante PCR, con cebadores específicos, se pudo estudiar todas las cepas, encontrando que POX096, POX106 y POX110 también pertenecían a IPIO-1. Además, que las cinco cepas pertenecían a IPIO-2 e IPIO-3. Y que sólo POX067 y POX109 pertenecían a IPIO-4 (Figura 14). Este último resultado se pudo confirmar mediante secuenciamiento del producto de PCR y clonamiento teniendo un 99% de identidad en el NCBI.

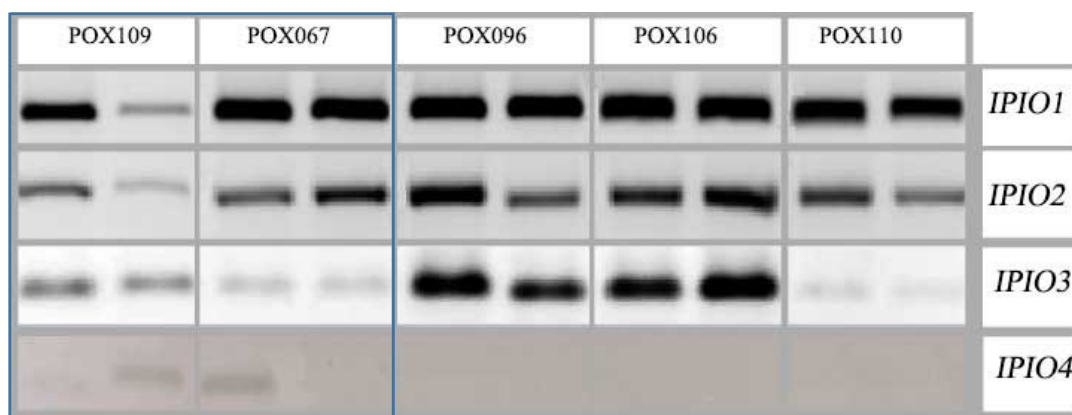


Figura 14. Variantes alélicas de *lpiO* para las cinco muestras Yungay inoculadas con las cepas POX109, POX067, POX096, POX106 y POX110 mediante cebadores específicos.

Avr-vnt1

Mediante la amplificación del ADNc de las muestras con los cebadores *Avr-vnt1SP* (Pel, 2010), resultó favorable en todos los días para POX67 y no para POX109 en el día 3 (Figura 15).

Así también, se probaron las tres cepas adicionales: POX096, POX106 y POX110 (Figura 15), obteniendo que POX110 y POX106 fueron detectados en los 3 dpi, a diferencia de POX096 que sólo fue detectado a los 3 dpi.

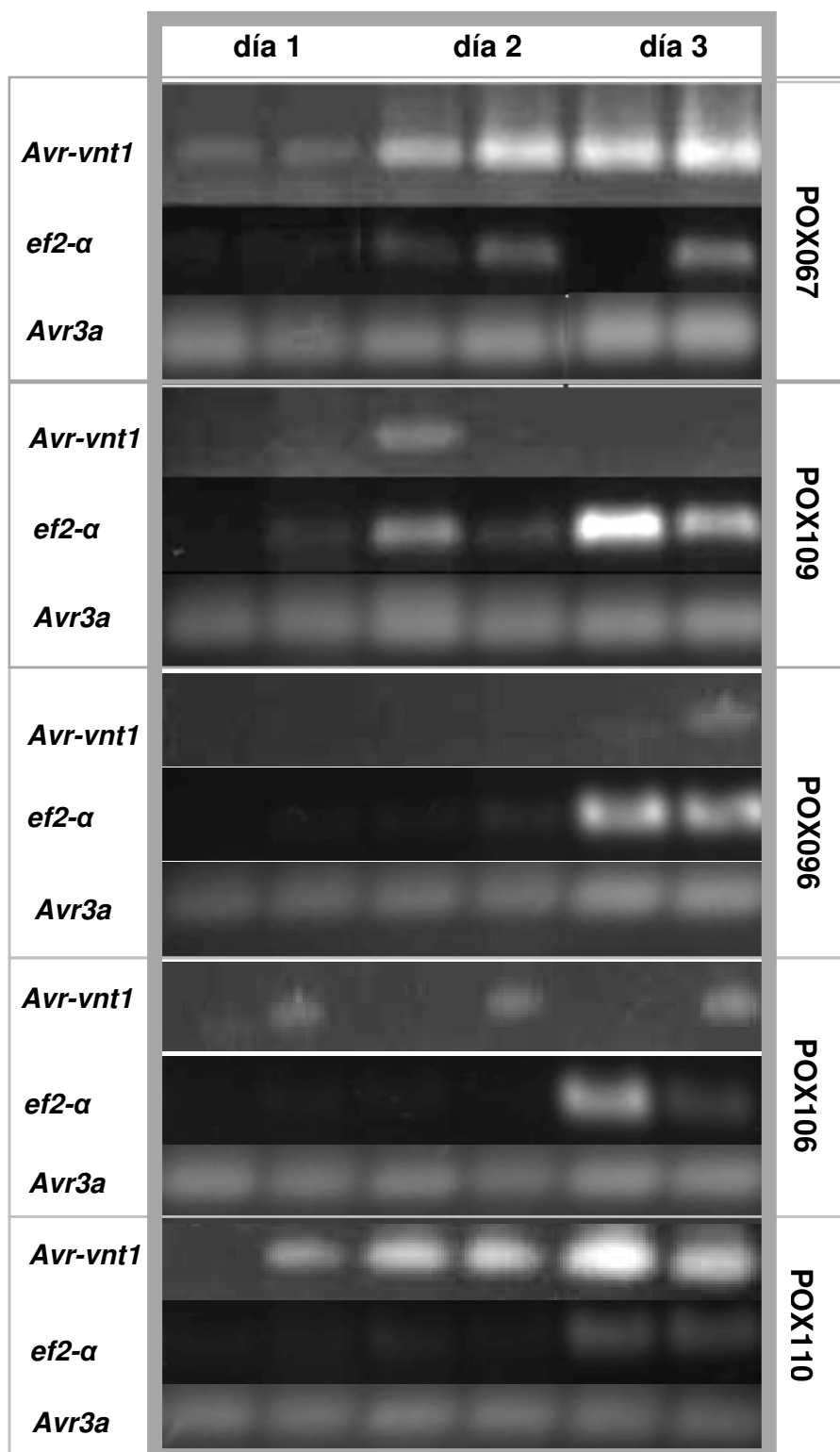


Figura 15. Resultados de RT-PCR con cebadores *Avr-vnt1*SP (393pb), *ef2α* (182pb), y *Avr3a* (169pb) de folíolos de Yungay inoculados con cepas POX067, POX109, POX096, POX106 y POX110.

5.1.6 Validación de la expresión diferencial por qRT-PCR

La eficiencia de los cebadores estuvo en el rango de 99-100% (Figura 16). Las muestras de ARN fueron colectadas al 1, 2 y 3 dpi, y analizamos la expresión cinética de los genes efectores (PITG_21388: *Avr-blb1*, PITG_16294: *Avr-vnt1*, PITG_04085: *Avr-blb2*, PITG_14371: *Avr3a* y PITG_22089: *Avh9.1*) y dos proteínas hipotéticas (PITG_17400, PITG_11584), así como el gen de referencia *ef2α* en estos puntos de tiempo para todas las cepas de *P. infestans*. En todas las cepas el gen de referencia fue detectado adecuadamente en el día 3 (Figura 17), mientras claros picos de “melting” fueron vistos por todos los genes efectores comenzando del día 1 en todas las cepas, con las excepciones de PITG_16294 con POX109 sólo en el día 3, PITG_14371 con POX096 y POX110 desde el día 2 y para PITG_22089 con POX067 sólo en el día 3. Los genes de proteínas hipotéticas fueron detectados desde el día 1 con POX109 y POX067, para el caso de POX106 y POX110 fue desde el día 2 y para POX096 sólo en el día 3. Las curvas de disociación de los demás genes son mostradas en el Anexo 2. Como el gen de referencia fue expresado sólo al 3dpi sólo fue posible analizar la expresión en ese punto. Los genes efectores *Avr-vnt1*, *Avr-blb1*, *Avr-blb2*, *Avr-3a*, *Avh9.1*. En acuerdo con el análisis de “cuffdiff”, el análisis de qRT-PCR confirmó que POX109 no expresó el *Avr-vnt1*, mientras las otras cepas lo hicieron. La expresión de este gen fue similarmente alta en POX067 ($p < 0.05$) comparado a los otros aislamientos. Similarmente, *Avh9.1* fue silenciado en POX067 y expresado en las otras cepas, aunque a un nivel muy bajo, diferencias estadísticas no fueron detectadas (Figura 18) (Anexo 3). Los otros tres efectores *Avr* (*Avr-blb1*, *Avr-blb2* y *Avr3a*) fueron expresados en todas las cepas en el mismo nivel, no siendo detectadas diferencias estadísticas también.

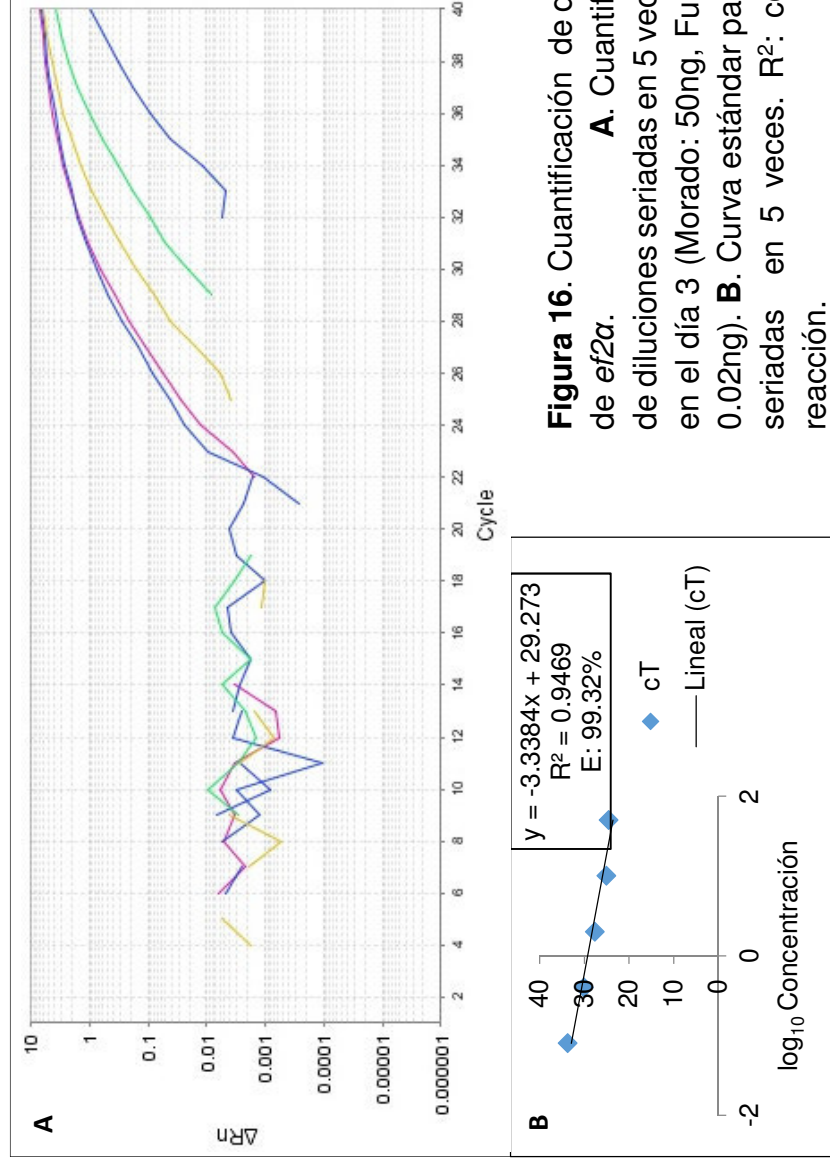


Figura 16. Cuantificación de diluciones seriadas de ADNc usando cebadores de *ef2 α* . **A.** Cuantificación de la amplificación PCR por Real Time de diluciones seriadas en 5 veces de cDNA de Yungay inoculado con POX096 en el día 3 (Morado: 50ng, Fucsia: 10ng, Amarillo: 2ng, Verde: 0.1ng y Azul: 0.02ng). **B.** Curva estándar para el análisis de PCR cuantitativo de diluciones seriadas en 5 veces. R^2 : coeficiente de correlación, E: Eficiencia de la reacción.

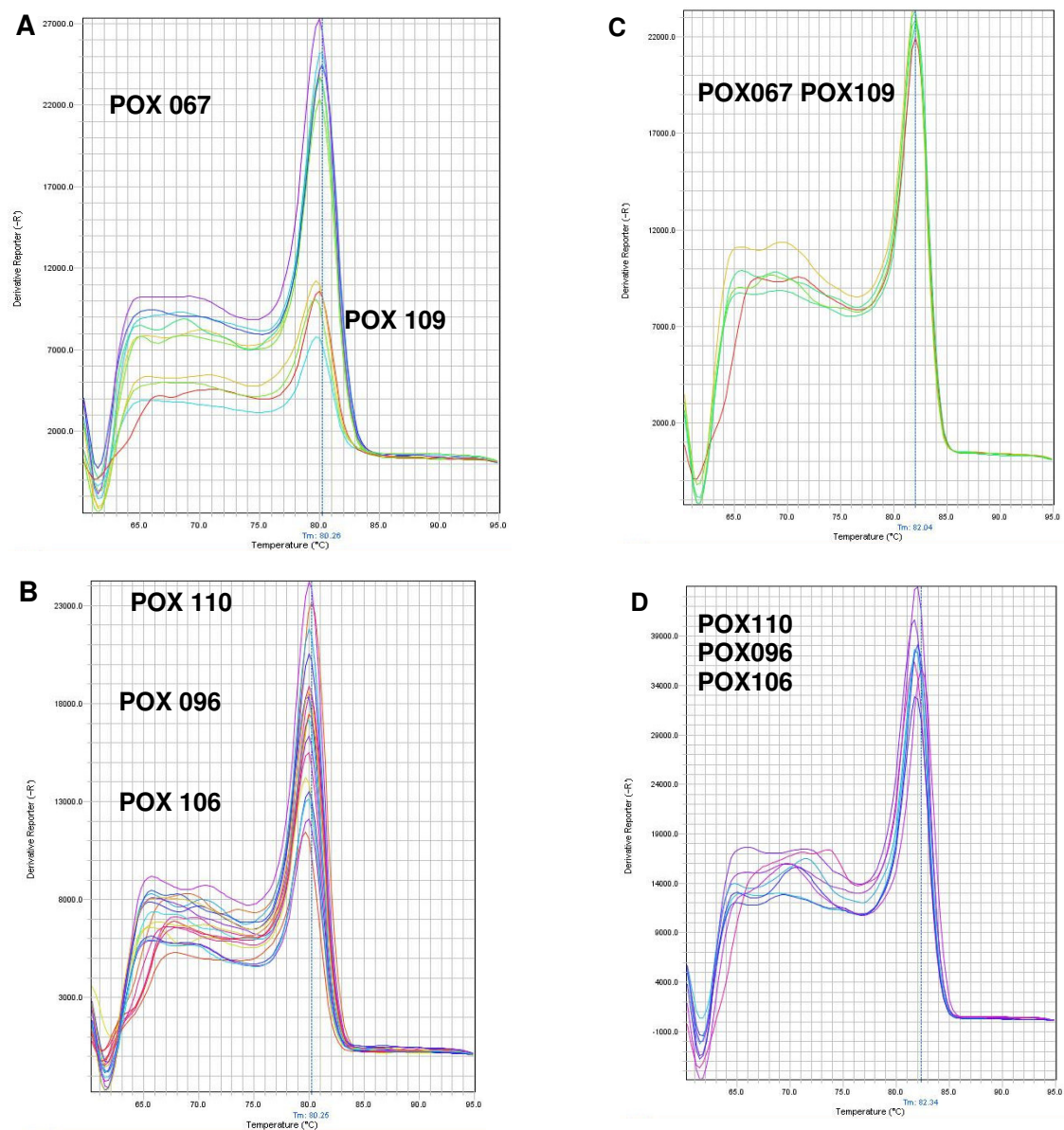


Figura 17. Curvas de disociación con 1 pico. A y B: **PITG_16294**: *Avr-vnt1*, C y D: *ef2a* en el día 3 para cepas POX 067, POX109, POX110, POX096 y POX106.

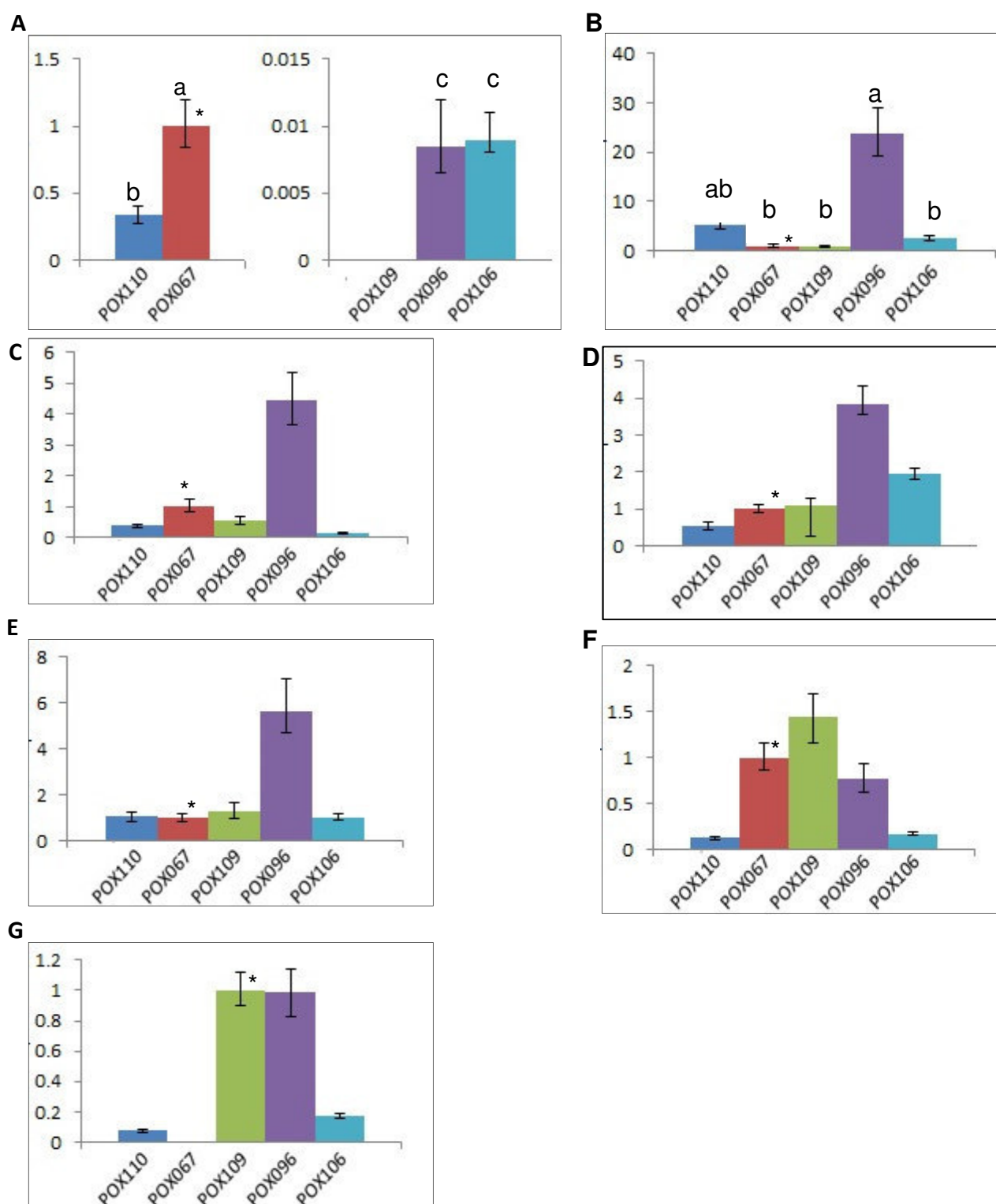


Figura 18. Niveles de expresión relativa de genes PITG de *P. infestans* A. PITG_16294, B. PITG_17400, C. PITG_11584, D. PITG_04085, E. PITG_21388, F. PITG_14371 y G. PITG_22089 en “Yungay” al 3 dpi con cepas POX110, POX067, POX109, POX096 y POX106. Niveles de expresión fueron normalizados con el gen *ef2α*. *relativo a esa cepa. Diferencias estadísticas significativas son mostradas por diferentes letras mostradas encima de las barras.

5.2 Identificación de cepas que expresan los genes *Avr-vnt1* con la planta transgénica Desiree [*Rpi-vnt1.1*]

5.2.1 Evaluación Fenotípica: Se obtuvieron 4 eventos que fueron importantes fenotípicamente por presentar al menos con una cepa la reacción de hipersensibilidad (RH): 5, 6, 12 y 55. Los tres primeros mostraron mayor resistencia para la cepa POX109, en contraposición a la cepa POX067; y el último evento 55 fue el más importante debido a que con ambas cepas presentó la reacción de hipersensibilidad (RH) (Figura 19). En el caso de los controles: Para la variedad susceptible Yungay la enfermedad infectó el área foliar en 90-100%, sin embargo, para el caso de la variedad resistente Lbr-40 se comportó resistente para ambas cepas, lo cual lo diferencia del punto 5.1.

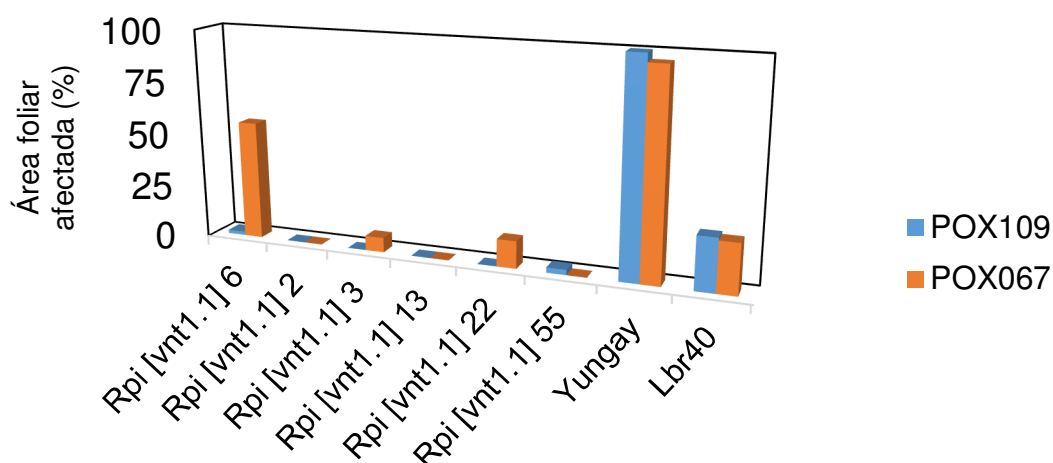


Figura 19. Agresividad de las cepas de *P. infestans* POX109 y POX067 en los eventos transgénicos 6, 2, 3, 13, 22, 55 en Desiree conteniendo el gen *Rpi-vnt1.1*. Con controles susceptible Yungay y resistente Lbr40. La incidencia de la enfermedad está mostrada como el porcentaje (%) de área foliar afectada a los 5 dpi. Siendo graficado el promedio de las 5 repeticiones biológicas.

5.2.2 Evaluación molecular de Plantas transgénicas *Rpi-vnt1*

Las muestras inoculadas con POX109 y POX067 fueron evaluadas en su calidad de ARN.

Luego del RT-PCR, las muestras de los eventos transgénicos [*Rpi-vnt1.1*] 6, 2, 3, 13, 22 y 55 inoculados con POX109 y POX067 presentaron expresión del gen *Avr-vnt1* al 3er dpi (Figura 20.A). Así mismo, se comparó la expresión del gen de avirulencia con la del gen de resistencia (Figura 20.B) gracias a la data proporcionada en Román (2016) para tener un completo panorama de la evaluación. Además, las muestras control Yungay presentaron la expresión de *Avr-vnt1* en las cepas de POX109 y POX067 al 3dpi (Figura 20.A) a diferencia del anterior evento de inoculación según los resultados fenotípicos descritos en el punto 5.2.1.

Esta contradicción nos llevó a secuenciar cDNA de POX109, del anterior experimento que fue inoculado en Yungay, con el cebador SP-*Avr-vnt1* (Pel, 2010), obteniendo que al 3 dpi si se presenta *Avr-vnt1* en un bajo nivel de significancia (97%).

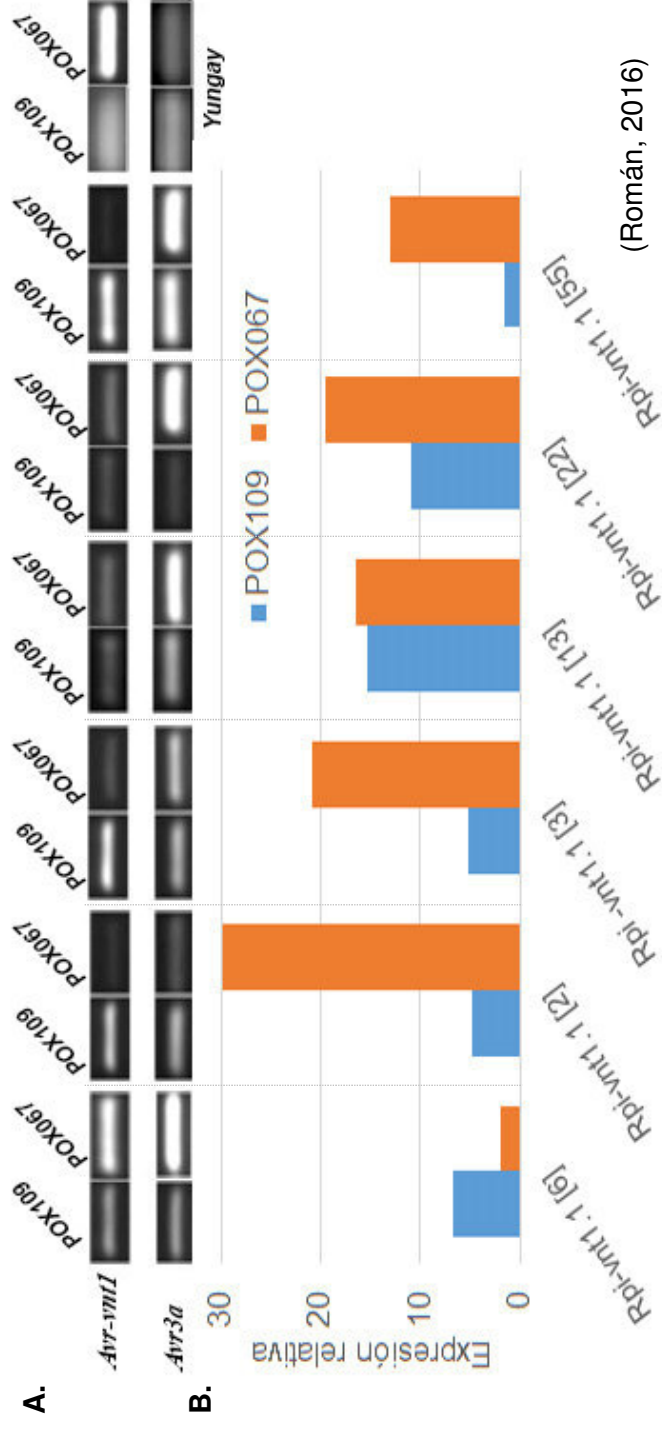


Figura 20. Respuestas de inoculaciones con las cepas de *P. infestans* POX109 y POX067 al 3 dpi. **A.** Resultados de RT-PCR con cebadores *Avr-vnt1*SP (393pb) y *Avr3a* (169pb) de folíolos de los eventos transgénicos Desiree [*Rpi-vnt1.1*] 6, 2, 3, 13, 22 y 55 y el control susceptible Yungay. **B.** Resultados de expresión relativa del transgén en folíolos de los eventos transgénicos (Román, 2016).

VI. DISCUSIÓN

La era genómica, provee una idea de los mecanismos y procesos para el conocimiento de la patogenicidad de *P. infestans* (Fry et al., 2015). Los análisis de la expresión genética de alto procesamiento por el secuenciamiento de bibliotecas de ADNc, microarreglos y la tecnología de ARN-seq, son herramientas valiosas para el estudio de las diferentes familias de genes presentes en la interacción planta-patógeno (Raffaele et al., 2010), recientemente el ARN-seq ha emergido como la tecnología preferida para el análisis del transcriptoma y perfiles de expresión génica, permitiendo estudiar los cambios de expresión en el patógeno como en el hospedero, así mismo vía un ensamblaje *de novo*, permite identificar genes en ausencia de un genoma de referencia de un oomiceto (Ward et al., 2012).

El reto de identificar genes *Avr* para la comprensión del patosistema papa-*Phytophthora infestans* en el contexto peruano es importante para el diseño de programas de diagnóstico, prevención y mejoramiento de la resistencia a *P. infestans*. Así, se escogió cepas de *P. infestans* diferenciados en sus patrones de virulencia, y en sus respuestas fenotípicas, llevándose el ensayo en una variedad de papa susceptible; gracias a esto se logró una alta expresión de efectores. Así, mediante el análisis del transcriptoma en condiciones de respuesta a la infección en la planta, fueron identificados genes RXLR que exhibieron su patrón de expresión en la fase biotrófica de infección, similar a lo estudiado previamente por Haas et al. (2009) y Whisson et al. (2007). Por otro lado, perfiles comparables de inducción durante la fase biotrófica han sido descritos para los genes efectores RXLR de *P. sojae* (Wang et al., 2011).

El genoma completo de *P. infestans* presenta 17,797 genes codificantes de proteínas. Su genoma está compuesto por una serie de efectores y moduladores con la capacidad de alterar la especificidad de la célula hospedadora (Haas et al., 2009). En la presente investigación fueron 13,139 genes transcritos activamente, expresados en al menos una de las dos muestras susceptibles inoculadas con las diferentes cepas de *P. infestans* pertenecientes al linaje clonal EC-1, estos transcritos cubren un amplio rango de funciones ontológicas de los cuales 210 fueron RXLR, también se presentaron proteínas hipotéticas, proteínas secretoras,

proteínas estructurales, proteínas de transporte, endoglucanasas, proteínas de choque térmico, entre otras. Esto sugiere la importancia de los elementos de transcripción en la activación del sistema de defensa durante las interacciones planta-patógeno (Siddappa *et al.*, 2014). Así por ejemplo, presentó genes *CesA*, cuyas proteínas están involucradas en la formación del apresorio, estando localizadas en el extremo de crecimiento de la estructura de infección, siendo un elemento esencial para la patogenicidad (Grenville-Briggs *et al.*, 2008), siendo en este caso más alto el nivel en POX109 comparado con POX067. En el caso de proteínas útiles para la patogenicidad, así como las RXLR, se encuentran las proteasas y los inhibidores de proteasas, así en nuestro caso, picos más altos se muestran en los inhibidores de proteasas similar Ah-Fong *et al.* (2017), inhibiendo proteasas del hospedero y facilitando su infección, como es el caso de los inhibidores de Serinoproteasa. En el caso de los factores de transcripción, los bZIPs actúan como dímeros, así su actividad puede ser determinada por la combinación de etapas específicas y subunidades constitutivas (Ah-Fong *et al.*, 2017), en nuestro caso estuvieron presentes 15 proteínas bZIPs con bajos niveles de expresión. Sobre las proteínas quinasas (n=491), que une un grupo fosfato a la proteína; y las fosfatasas (n=103), que elimina este grupo, la primera mostró más altos niveles de expresión comparado con la segunda, así por ejemplo para el gen PITG_09596 (quinasa) versus PITG_02038 (fosfatasa), mostró 6 veces más de expresión. En el caso de los transportadores de nutrientes, los grupos: Permeasa aminoacídica auxina (n=37), y el de aminoácido-poliamina-cationes orgánicos (n=15), presentaron bajo nivel de expresión, esto es lógico ya que en el caso de las esporas es poco probable que adquieran muchos de sus nutrientes desde el exterior.

Entre las limitaciones del ARN-seq se encuentra que para la caracterización funcional de genes faltan las secuencias homólogas en los dominios públicos (Guo *et al.*, 2016). Así tenemos 1024 “gene id” sin nombre de gen que no han sido considerados. También, las anotaciones funcionales estuvieron incompletas desde que unigenes frecuentemente contenían sólo parte de la secuencia codificante de la proteína (Ah-Fong *et al.*, 2017), estos genes huérfanos están localizadas en áreas del genoma de *P. infestans* que no fueron secuenciados, o si fueron secuenciados, pueden haber sido incorrectamente ensamblados e incorrectamente

anotados; otra posible razón es que ellos corresponden a ARNs no codificantes; una tercer razón, que ellos representan secuencias de regiones no traducida (UTR) que no fueron incluidas en los genes pronosticados; una cuarta razón es que ellos corresponden a genes *novel* de esta cepa en particular; una quinta, es que ellos son pseudogenes expresados; y una sexta razón puede ser, que ellos son productos de empalme alternativo (Zuluaga et al., 2016).

En el presente estudio las cepas de *P. infestans* en el linaje clonal EC-1 mostraron variación de expresión de efectores, así como variación fenotípica de virulencia en papa. Algunos estudios en poblaciones de *P. infestans* indican una baja diversidad genética, representada por un linaje clonal dominante pero con alta diversidad de virulencia (Delgado *et al.*, 2013). Aquí se demuestra que la variación es verdadera entre cepas a nivel fenotípico y de expresión del gen. Algunas diferencias de expresión entre las dos cepas, pueden indicar que algunos efectores pueden ser esenciales para la infección de la papa, y no deben ser perdidos para su correcto reconocimiento (Fry et al., 2015). Así diferentes niveles de interacción entre genes *Rpi-Avr*- pueden reflejar la activación de diferentes vías de defensa cuya activación está reflejada en diferentes mecanismos (Pel, 2010). De las cinco cepas probadas, sólo la POX109 presentó el silenciamiento génico y no expresó completamente el gen *Avr-vnt1*. Además, cuando la misma cepa fue re-cultivada para el ensayo con transgénicos (*Rpi-vnt1.1*) presentó, en contraposición al resultado anterior, expresión del gen *Avr-vnt1* en POX109 y en POX067 cuando fue inoculada en el cultivar susceptible y en el evento transgénico. Con respecto a los eventos transgénicos se observó un incremento de expresión a partir de 1 dpi, permitiendo ser reconocido por el gen de avirulencia (Román, 2016). Estudios sobre la expresión del gen *R* mostró variedad de niveles de inducción dependiendo del genotipo de la papa y la cepa de *P. infestans* usada. Así en una interacción incompatible, la expresión del gen *Rpi-phu1* mostró ser inducida 1 dpi en líneas mejoradas diploides pero no en líneas mejoradas tetraploides (Śliwka *et al.*, 2006), mientras otras líneas de papa no mostraron inducción durante la interacción incompatible, pero mostraron una inducción tardía (día 5) durante una interacción compatible (Stefańczyk et al., 2017). Por lo tanto, la relación de la expresión del gen *Rpi-vnt1.1/ Avrnt1* parece depender de la interacción específica entre el genotipo de la papa y la cepa de *P. infestans*.

Mayor investigación es necesaria para estudiar el patrón de expresión de *Avr-vnt1*. Así, cambios similares en estado de expresión del gen *Avr* de la misma cepa ha sido mostrado en *P. sojae* (Na *et al.*, 2014). Esta es una explicación atractiva para el fenómeno observado comúnmente en el cambio de patrones de virulencia en la interacción papa – *P. infestans*. Además, la misma cepa puede tener alterada la expresión del gen luego de su colecta en medio de cultivo. Pudiendo así, los procedimientos de almacenamiento de las cepas en medios artificiales y/o su multiplicación en rodajas de papa u hojas antes de ser utilizados en experimentos de adaptación del hospedero, influenciar en los resultados de virulencia y agresividad (Zarzycka, 1996; 2001). Así también, las condiciones experimentales para preparar el inóculo de *P. infestans*, pudieron resetear la expresión del gen *Avr-vnt1*. Foster *et al* 2009 y Pel (2009) usaron Agar Rye B y altas concentraciones de inóculo (50,000 esporangios / mL) mientras que nosotros usamos rodajas de papa y 3,000 esporangios / mL). Así mismo, la virulencia (ganancia o pérdida) puede ser afectada por los cambios durante la reproducción asexual (Samen *et al.*, 2003). Estos cambios no son resultado de alteraciones de la secuencia de ADN del gen *Avr*. Sino que puede ocurrir a través de la adquisición o la evolución de un efector epistático que suprime el evento de la activación inmunológica causado por el efector *Avr*. Otra manera es por la alteración de su expresión génica, basado en epialelos idénticos, que pueden existir en varios estados transcripcionales variando en su expresión, los cambios epigenéticos que no dependen de cambios en las secuencias de ADN es la más acertada explicación para los cambios reversibles en la virulencia. Estas soluciones adaptativas beneficia la conservación de la secuencia del gen *Avr* por sí misma (Na & Gijzen, 2016).

El silenciamiento de genes efectores, especialmente los del tipo de efectores RXLR, es aparentemente un importante mecanismo de regulación de la virulencia/avirulencia en estas cepas. Esto ha sido mostrado en el silenciamiento de *Avr-vnt1* que lleva al escape del reconocimiento por el gen R *Rpi-vnt1* en el linaje clonal EC-1, siendo sólo uno probado de este linaje (Pel *et al.*, 2009; Foster *et al.*, 2009; Pel, 2010). Similar estudio fue realizado por Stefańczyk *et al.* (2017) quien concluye que esta inactivación no es una simple característica genética para una cepa de *P. infestans* (variación en las regiones promotoras, genes regulatorios o silenciamiento génico) es más la habilidad para reaccionar a factores ambientales

específicos y depende especialmente del reconocimiento del gen *Rpi* del genotipo de la papa para la activación de la RH. Con respecto al gen de resistencia *Rpi-vnt1*, éste fue clonado de las especies de Sur América *S. venturii* (Foster et al., 2009) y luego fue mostrado que *Rpi-phu1* originario de *Solanum phureja* (Zimnoch) es idéntico a *Rpi-vnt1.1* (Pel, 2010), el grupo de papa Phureja ha sido comúnmente cultivado en los Andes, pudiendo ser posible que el silenciamiento de *Avr-vnt1* sea un resultado de la co-evolución. Sin embargo, se desconoce si este gen de resistencia es común en la totalidad de genes de Phureja. La regulación epigenética de la expresión del gen de *Avr* puede servir como un mecanismo reversible el cual permite la conservación de genes *Avr* para su uso futuro (Gijzen et al., 2014). Así mismo, efectores pueden ser duplicados y mutados, y las copias pueden ser silenciadas sin comprometer la eficiencia de la infección del patógeno. Stefańczyk et al. (2017) detectó mediante qRT-PCR expresión de *Avr-vnt1* en cepas virulentas de una línea mejorada sin el gen *Rpi-phu1*, pero no detectó expresión cuando las mismas cepas infectaron líneas mejoradas con el gen *Rpi-phu1*. El silenciamiento al 2 dpi y su posterior activación al 3 dpi, no resultó en resistencia. En nuestro caso, en el cultivar susceptible, el silenciamiento fue confirmado por qRT-PCR al 3 dpi para POX109, mostrando una reducción escalonada (Izarra et al., 2014). A través de todos los estudios, incluyendo los nuestros, la expresión del gen *Avr-vnt1* ha sido muy baja en las cepas virulentas y no existe evidencia clara aún si ésta detección en plantas de papa sin los genes *Rpi-vnt1.1* o *Rpi-phu.1* reflejan un real cambio en la expresión. Estas variaciones enfatizan por qué el control de *P. infestans* permanece como un problema para la seguridad alimentaria (Fry et al., 2015). Con respecto a las variaciones de SNPs sólo fue analizado POX067, pero se piensa acorde a anteriores trabajos (Yin et al., 2017; Pel, 2010; Rietman et al., 2012), que las substituciones no influenciaron la función del gen *Avr-vnt1*.

Para *Avr3a*, en nuestros resultados no se evidencia silenciamiento ni diferencias significativas en la expresión entre las dos cepas. En contraposición a lo hallado, en las variedades de cepas de *P. sojae* se mostró silenciamiento y las que fueron avirulentas en el cultivo de soya expresaron *Avr3a* (Qutob et al., 2009). En las poblaciones de *P. infestans*, *Avr3a* tiene dos variantes alélicas mayores codificando las proteínas AVR3a^{KI} y AVR3a^{EM}, siendo el primero de estos el que induce la resistencia mediada por R3a (Armstrong et al., 2005). El silenciamiento en este gen

está ligado a los pequeños ARN, que se posicionan en transposones y genes de familia de efectores (Na & Gijzen, 2016) que previene la acumulación del patógeno y el progreso de la enfermedad (Sanju *et al.*, 2015). Experimentos mediante el silenciamiento artificial por micro RNA de interferencia del gen *Avr3a* en *P. infestans* demuestran una resistencia moderada al TT (Sanju *et al.*, 2015; Thakur *et al.*, 2015).

Para *Avr-blb1*, mediante ARNseq sólo fue detectado *IpiO1* (Clase I), pero mediante RT-PCR fue detectado *IpiO1*, *IpiO2* (Clase I), *IpiO3* (Clase II) e *IpiO4* (clase III), siendo ambos métodos complementarios no excluyentes (Costa *et al.*, 2013). *IpiO4* no sólo elude la detección por RB, sino también es capaz de inhibir la RH mediada por *IpiO1*. Sin embargo, aún no se saben los efectos de *IpiO2* ni *IpiO3* (Halterman *et al.*, 2010), por lo tanto no podríamos llegar a la conclusión que el gen RB no sería útil para programas de mejoramiento de la resistencia para las cepas EC-1 probadas. Mayor investigación es necesaria con el gen *RB*, ya que es pensado que con ingeniería genética introduciendo el gen *RB* homólogo de especies silvestres de *S. pinnatisectum*, que no mostraron interacción con IPI-O1 ni IPI-O4, se podría escapar de la supresión de la resistencia por IPI-O4 (Chen *et al.*, 2012).

Para *Avr-blb2*, el aminoácido número 69 de la proteína AVRblb2 es crítico en el reconocimiento por *Rpi-blb2*, de modo que los homólogos AVRblb2 que son reconocidos por *Rpi-blb2* tienen Val, Ala o Ile, y los que no son reconocidos tienen Phe (Oh *et al.*, 2009). Una de las cepas estudiadas POX067, que expresó variantes Ala y Phe (vía ARN-seq) y Ala, Ile, Val y Phe (vía secuenciación de los productos del RT-PCR), fue probada para ver si la virulencia cambiaba por la sobre-inoculación con *P. infestans*. Sin embargo, no se registraron cambios en las respuestas. Sugiriendo que ambas variantes avirulentas y virulentas pueden tener importantes roles en la patogenicidad (Orbegozo *et al.*, 2016). Este resultado sugiere que estas cepas podrían hacer avirulentas a las plantas de papa con el gen *Rpi-blb2*.

VII. CONCLUSIONES

- Se logró identificar efectores de *P. infestans* con expresión diferencial (n=8) y ausencia de expresión en el linaje clonal EC-1. Algunos de los efectores identificados tienen una función conocida como genes de avirulencia.
- Los efectores presentes en las POX067 y POX109 cepas contienen el mismo perfil de SNP para *Avr-blb2* y *Avr-blb1*. Por lo tanto, la variabilidad alélica no tuvo predominancia frente a la variabilidad de expresión de genes.
- El silenciamiento de genes de avirulencia, como *Avr-vnt1* sugiere que los genes de resistencia *Rpi-vnt1.1* no serían funcionales en cepas presentes en el Perú. En cambio, los genes *Avr-blb1* y *Avr-bl2* sí podrían ser útiles en el desarrollo del mejoramiento genético para resistencia.

VIII. RECOMEDACIONES

- En la presente investigación para las muestras de hoja de Yungay inoculadas con las cepas POX109 y POX067, se utilizó toda la hoja para el secuenciamiento de ARNseq. En este punto hubiese sido mejor inocular puntualmente y cortar solo los trozos inoculados. Para que haya mayores lecturas mapeadas al genoma de referencia, es decir mayor cantidad de genes detectados a nivel de expresión.
- Para poder tener un completo análisis de lo que ocurre en el patosistema planta-patógeno, se recomienda analizar más cepas del mismo linaje clonal. Además, incluir cepas que no tengan expresión de *Avr-vnt1* en el campo y chequear que sucede luego de su almacenamiento.
- Repetir este ensayo un par de veces más, para ver determinar la reproducibilidad del silenciamiento de *Avr-vnt1*.
- Es recomendable incluir más repeticiones biológicas ya que el mínimo necesario para estudios de expresión génica son 3.
- Los métodos de expresión génica cualitativos (RT-PCR) y cuantitativos (ARN-seq y qRT-PCR) se utilizan de diferentes maneras, el RT-PCR útil para un chequeo rápido de presencia y/o ausencia, tanto éste como el qRT-PCR dependen del buen diseño de los cebadores. En el qRT-PCR se puede obtener la estimación de la abundancia de transcritos de sólo el gen de interés mediante utilización de controles negativos para normalizar la expresión y mediante ARN-seq se puede obtener la expresión diferencial de genes. Entre los beneficios del ARN-seq versus qRT-PCR evita la saturación por señales de fluorescencia y permiten obtener un panorama más global de los genes activados y/o reprimidos sin restringirse a genes previamente caracterizados.
- El método de transformación génica será el método de validación si los genes de resistencia resultan eficientes en el ambiente ante cada patógeno.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ah-Fong, A. M., Kim, K. S. and Judelson, H. S. (2017) RNA-seq of life stages of the oomycete *Phytophthora infestans* reveals dynamic changes in metabolic, signal transduction, and pathogenesis genes and a major role for calcium signaling in development. *BMC genomics*, **18**, 198.
- Andrivon, D. (1994) Race structure and dynamics in populations of *Phytophthora infestans*. *Canadian Journal of Botany*, **72**, 1681-1687.
- Armstrong, M. R., Whisson, S. C., Pritchard, L., Bos, J. I., Venter, E., Avrova, A. O., *et al.* (2005) An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 7766-7771.
- Birch, P. R., Rehmany, A. P., Pritchard, L., Kamoun, S. and Beynon, J. L. (2006) Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends in microbiology*, **14**, 8-11.
- Black, W., Mastenbroek, C., Mills, W. and Peterson, L. (1953) A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. *Euphytica*, **2**, 173-179.
- Cock, P. J., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M. L. and Rice, P. M. (2010) The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic acids research*, **38**, 1767-1771.
- Collinge, D. (2016) *Plant Pathogen Resistance Biotechnology*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Condori, J., Nopo-Olazabal, C., Medrano, G. and Medina-Bolivar, F. (2011) Selection of reference genes for qPCR in hairy root cultures of peanut. *BMC research notes*, **4**, 392.
- Cooke, D. and Lees, A. (2004) Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathology*, **53**, 692-704.
- Cornelissen, B. J. and Melchers, L. S. (1993) Strategies for Control of Fungal Diseases with Transgenic Plants. *Plant physiology*, **101**, 709-712.
- Costa, C., Giménez-Capitán, A., Karachaliou, N. and Rosell, R. (2013) Comprehensive molecular screening: from the RT-PCR to the RNA-seq. *Translational lung cancer research*, **2**, 87-91.
- Chen, Y., Liu, Z. and Halterman, D. A. (2012) Molecular determinants of resistance activation and suppression by *Phytophthora infestans* effector IPI-O. *PLoS pathogens*, **8**, e1002595.
- Dangl, J. L., Dietrich, R. A. and Richberg, M. H. (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell*, **8**, 1793.
- Day, J. and Shattock, R. (1997) Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology*, **103**, 379-391.
- De Bona, F., Ossowski, S., Schneeberger, K. and Rätsch, G. (2008) Optimal spliced alignments of short sequence reads. *BMC Bioinformatics*, **9**, O7.
- De Jong, F. M. and De Snoo, G. R. (2002) A comparison of the environmental impact of pesticide use in integrated and conventional potato cultivation in The Netherlands. *Agriculture, ecosystems & environment*, **91**, 5-13.

- Degner, J. F., Marioni, J. C., Pai, A. A., Pickrell, J. K., Nkadori, E., Gilad, Y., *et al.* (2009) Effect of read-mapping biases on detecting allele-specific expression from RNA-sequencing data. *Bioinformatics*, **25**, 3207-3212.
- Delgado, R., Monteros-Altamirano, A., Li, Y., Visser, R., Lee, T. and Vosman, B. (2013) Large subclonal variation in *Phytophthora infestans* populations associated with Ecuadorian potato landraces. *Plant Pathology*, **62**, 1081-1088.
- Dieffenbach, C., Lowe, T. and Dveksler, G. (1993) General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl*, **3**, S30-S37.
- Dong, S., Qutob, D., Tedman-Jones, J., Kuflu, K., Wang, Y., Tyler, B. M., *et al.* (2009) The *Phytophthora sojae* avirulence locus Avr3c encodes a multi-copy RXLR effector with sequence polymorphisms among pathogen strains. *PLoS One*, **4**, e5556.
- Drenth, A., Tas, I. C. and Govers, F. (1994) DNA fingerprinting uncovers a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, **100**, 97-107.
- Driver, C. (1958) Races of potato blight, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, **1**, 527-530.
- Edgren, H., Murumagi, A., Kangaspeska, S., Nicorici, D., Hongisto, V., Kleivi, K., *et al.* (2011) Identification of fusion genes in breast cancer by paired-end RNA-sequencing. *Genome Biol*, **12**, R6.
- Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K. (1996) *Phytophthora diseases worldwide*. American Phytopathological Society (APS Press).
- Estrada, N. (2000) *La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa*. Plural editores.
- FAO (2008) International Year of the Potato. USA.
- Flier, W. G., Grünwald, N. J. and TURKENSTEEN, L. J. (2001) Formation, production and viability of oospores of *Phytophthora infestans* from potato and *Solanum demissum* in the Toluca Valley, central Mexico. *Mycological Research*, **105**, 998-1006.
- Flor, H. H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology*, **9**, 275-296.
- Forbes, G. A., Goodwin, S. B., Drenth, A., Oyarzun, P., Ordoñez, M. E. and Fry, W. E. (1998) A global marker database for *Phytophthora infestans*. *Plant Disease*, **82**, 811-818.
- Foster, S. J., Park, T.-H., Pel, M., Brigneti, G., Sliwka, J., Jagger, L., *et al.* (2009) *Rpi-vnt1. 1*, a Tm-22 homolog from *Solanum venturii*, confers resistance to potato late blight. *Molecular plant-microbe interactions*, **22**, 589-600.
- Fry, W. (2008) *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Mol Plant Pathol*, **9**.
- Fry, W., Birch, P., Judelson, H., Grünwald, N. J., Danies, G., Everts, K. L., *et al.* (2015) Five Reasons to consider *Phytophthora infestans* a re-emerging pathogen. *Phytopathology*, **105**, 966-981.
- Fry, W., Goodwin, S., Matuszak, J., Spielman, L., Milgroom, M. and Drenth, A. (1992) Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. *Annual review of phytopathology*, **30**, 107-129.
- Garry, G., Salas, A., Forbes, G. A., Perez, W., Santa Cruz, M. and Nelson, R. J. (2005) Host specialization not detected among isolates of the EC-1 lineage of *Phytophthora infestans* attacking wild and cultivated potatoes in Peru. *European journal of plant pathology*, **113**, 71-81.

- Ghimire, S., Hyde, K., Hodgkiss, I., Shaw, D. and Liew, E. (2003) Variations in the *Phytophthora infestans* population in Nepal as revealed by nuclear and mitochondrial DNA polymorphisms. *Phytopathology*, **93**, 236-243.
- Gijzen, M., Ishmael, C. and Shrestha, S. D. (2014) Epigenetic control of effectors in plant pathogens. *Frontiers in plant science*, **5**, 638.
- Gilchrist Ramelli, E., Jaramillo Villegas, S., Afanador Kafuri, L. and Arango Isaza, R. E. (2009) Characterization of *Phytophthora infestans* populations in Antioquia, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, **62**, 5031-5037.
- Gómez-Alpizar, L., Hu, C.-H., Oliva, R., Forbes, G. and Ristaino, J. B. (2008) Phylogenetic relationships of *Phytophthora andina*, a new species from the highlands of Ecuador that is closely related to the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Mycologia*, **100**, 590-602.
- Goodwin, S. B. (1997) The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology*, **87**, 462-473.
- Goodwin, S. B., Cohen, B. A., Deahl, K. L. and Fry, W. E. (1994) Migration from northern Mexico as the probable cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, **84**, 553-558.
- Goss, E. M., Tabima, J. F., Cooke, D. E., Restrepo, S., Fry, W. E., Forbes, G. A., *et al.* (2014) The Irish potato famine pathogen *phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 8791-8796.
- Grenville-Briggs, L. J., Anderson, V. L., Fugelstad, J., Avrova, A. O., Bouzenzana, J., Williams, A., *et al.* (2008) Cellulose synthesis in *Phytophthora infestans* is required for normal appressorium formation and successful infection of potato. *The Plant Cell*, **20**, 720-738.
- Grosdidier, M., Aguayo, J., Marçais, B. and Ioss, R. (2016) Detection of plant pathogens using real-time PCR: how reliable are late Ct values? *Plant Pathology*.
- Guo, L., Allen, K. S., Deulio, G., Zhang, Y., Madeiras, A. M., Wick, R. L., *et al.* (2016) A De Novo-Assembly Based Data Analysis Pipeline for Plant Obligate Parasite Metatranscriptomic Studies. *Frontiers in Plant Science*, **7**.
- Guo, L., Zhu, X., Liu, G., Hu, J. and Ristaino, J. (2008) Genetic diversity of *Phytophthora infestans* from China. In: *3rd International Meeting*. Beijing: International Potato Center.
- Guttman, M., Garber, M., Levin, J. Z., Donaghey, J., Robinson, J., Adiconis, X., *et al.* (2010) Ab initio reconstruction of cell type-specific transcriptomes in mouse reveals the conserved multi-exonic structure of lincRNAs. *Nature biotechnology*, **28**, 503-510.
- Haas, B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., Jiang, R. H., Handsaker, R. E., Cano, L. M., *et al.* (2009) Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, **461**, 393-398.
- Halterman, D. A., Chen, Y., Sopee, J., Berduo-Sandoval, J. and Sánchez-Pérez, A. (2010) Competition between *Phytophthora infestans* effectors leads to increased aggressiveness on plants containing broad-spectrum late blight resistance. *PLoS One*, **5**, e10536.
- Haverkort, A., Boonekamp, P., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L., Kessel, G., *et al.* (2008) Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Research*, **51**, 47-57.

- Haverkort, A., Boonekamp, P., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L., Kessel, G., *et al.* (2016) Durable late blight resistance in potato through dynamic varieties obtained by cisgenesis: scientific and societal advances in the DuRPh project. *Potato Research*, **59**, 35-66.
- Hein, I., Birch, P. R., Danan, S., Lefebvre, V., Odeny, D. A., Gebhardt, C., *et al.* (2009) Progress in mapping and cloning qualitative and quantitative resistance against *Phytophthora infestans* in potato and its wild relatives. *Potato Research*, **52**, 215-227.
- Hein, I., McLean, K., Chalhoub, B. and Bryan, G. J. (2007) Generation and screening of a BAC library from a diploid potato clone to unravel durable late blight resistance on linkage group IV. *International journal of plant genomics*, **2007**.
- Henfling, J. W. (1987) *Late blight of potato*. International Potato Center.
- Huang, S., Zhang, J., Li, R., Zhang, W., He, Z., Lam, T.-W., *et al.* (2011) SOAPsplice: genome-wide ab initio detection of splice junctions from RNA-Seq data. *Front Genet*, **2**, 46.
- Izarra, M., Perez, W. and Lindqvist-Kreuzer, H. (2014) Identificación de efectores de *Phytophthora infestans* expresados diferencialmente en el linaje clonal EC-1.
- Jackson, S. D. (1999) Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiology*, **119**, 1-8.
- Jacobs, M. M., Vosman, B., Vleeshouwers, V. G., Visser, R. G., Henken, B. and van den Berg, R. G. (2010) A novel approach to locate *Phytophthora infestans* resistance genes on the potato genetic map. *Theoretical and applied genetics*, **120**, 785-796.
- Jo, K. R., Zhu, S., Bai, Y., Hutten, R. C., Kessel, G. J., Vleeshouwers, V. G., *et al.* (2016) Problematic Crops: 1. Potatoes: Towards Sustainable Potato Late Blight Resistance by Cisgenic R Gene Pyramiding. In: *Plant Pathogen Resistance Biotechnology*. pp. 185.
- Jones, J. D. and Dangl, J. L. (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329.
- Kamoun, S. (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **44**, 41-60.
- Kato, M., Mizubuti, E. S., Goodwin, S. B. and Fry, W. E. (1997) Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Phytopathology*, **87**, 973-978.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., *et al.* (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, **27**, 95-125.
- Kuhl, J., Hanneman, R. and Havey, M. (2001) Characterization and mapping of Rpi1, a late-blight resistance locus from diploid (1EBN) Mexican *Solanum pinnatisectum*. *Molecular Genetics and Genomics*, **265**, 977-985.
- Langmead, B. and Salzberg, S. L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, **9**, 357-359.
- Li, B., Ruotti, V., Stewart, R. M., Thomson, J. A. and Dewey, C. N. (2010) RNA-Seq gene expression estimation with read mapping uncertainty. *Bioinformatics*, **26**, 493-500.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., *et al.* (2009) The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, **25**, 2078-2079.

- Li, R., Li, Y., Kristiansen, K. and Wang, J. (2008) SOAP: short oligonucleotide alignment program. *Bioinformatics*, **24**, 713-714.
- Lulai, E. C. and Freeman, T. P. (2001) The importance of phellogen cells and their structural characteristics in susceptibility and resistance to excoriation in immature and mature potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) periderm. *Annals of Botany*, **88**, 555-561.
- Llorente, B., Bravo-Almonacid, F., Cvitanich, C., Orlowska, E., Torres, H., Flawia, M., *et al.* (2010) A quantitative real-time PCR method for in planta monitoring of *Phytophthora infestans* growth. *Letters in applied microbiology*, **51**, 603-610.
- Magembe, E., Mwathi, M., Rivera, C., Roman, M., Orbegozo, J., Tovar, J., *et al.* (2013) Development of potato varieties resistant to late blight.
- Martin, M. D., Vieira, F. G., Ho, S. Y., Wales, N., Schubert, M., Seguin-Orlando, A., *et al.* (2016) Genomic characterization of a South American *Phytophthora* hybrid mandates reassessment of the geographic origins of *Phytophthora infestans*. *Molecular biology and evolution*, **33**, 478-491.
- Mastenbroek, C. (1952) Over de differentiatie van *Phytophthora infestans* mont. de Bary en de vererving van de resistentie van *Solanum demissum* Lindl. Kinsbergen.
- McGettigan, P. A. (2013) Transcriptomics in the RNA-seq era. *Current opinion in chemical biology*, **17**, 4-11.
- Michelmore, R. W. and Meyers, B. C. (1998) Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research*, **8**, 1113-1130.
- Milligan, S. B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P. and Williamson, V. M. (1998) The root knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *The Plant Cell*, **10**, 1307-1319.
- Miranda, M. B., Brenes, A. and Gómez-Alpízar, L. (2005) Complejidad fisiológica de *Phytophthora infestans* en Costa Rica. *Agronomía costarricense: Revista de ciencias agrícolas*, **29**, 21-29.
- Morel, J.-B. and Dangl, J. L. (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell death and differentiation*, **4**, 671-683.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. and Wold, B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods*, **5**, 621-628.
- Mukerji, K. G. (2004) *Fruit and vegetable diseases*. Springer.
- Na, R. and Gijzen, M. (2016) Escaping host immunity: new tricks for plant pathogens. *PLoS Pathog*, **12**, e1005631.
- Na, R., Yu, D., Chapman, B. P., Zhang, Y., Kuflu, K., Austin, R., *et al.* (2014) Genome Re-Sequencing and Functional Analysis Places the *Phytophthora sojae* Avirulence Genes *Avr1c* and *Avr1a* in a Tandem Repeat at a Single Locus. *PloS one*, **9**, e89738.
- Oh, S.-K., Young, C., Lee, M., Oliva, R., Bozkurt, T. O., Cano, L. M., *et al.* (2009) In planta expression screens of *Phytophthora infestans* RXLR effectors reveal diverse phenotypes, including activation of the *Solanum bulbocastanum* disease resistance protein *Rpi-blb2*. *The Plant Cell Online*, **21**, 2928-2947.
- Oliva, R. F., Cano, L., Raffaele, S., Win, J., Bozkurt, T. O., Belhaj, K., *et al.* (2015) A recent expansion of the RXLR effector gene *Avrblb2* is maintained in global

- populations of *Phytophthora infestans* indicating different contributions to virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **28**, 901-912.
- Orbegozo, J., Roman, M. L., Rivera, C., Gamboa, S., Tovar, J. C., Forbes, G. A., *et al.* (2016) Rpi-blb2 gene from *Solanum bulbocastanum* confers extreme resistance to late blight disease in potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-13.
- Pais, M., Win, J., Yoshida, K., Etherington, G. J., Cano, L. M., Raffaele, S., *et al.* (2013) From pathogen genomes to host plant processes: the power of plant parasitic oomycetes. *Genome biology*, **14**, 1.
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L. J., Frey, B. J. and Blencowe, B. J. (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature genetics*, **40**, 1413-1415.
- Pathak, N. and Clarke, D. (1987) Studies on the resistance of the outer cortical tissues of the tubers of some potato cultivars to *Phytophthora infestans*. *Physiological and molecular plant pathology*, **31**, 123-132.
- Pel, M. (2010) Mapping, Isolation and characterization of genes responsible for Late Blight Resistance in Potato. Wageningen.
- Pel, M. A., Foster, S. J., Park, T.-H., Rietman, H., Arkel, G. v., Jones, J. D. G., *et al.* (2009) Mapping and Cloning of Late Blight Resistance Genes from *Solanum venturii* Using an Interspecific Candidate Gene Approach. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **22**, 601-615.
- Perez, W. (2008) *Manual técnico. El tizón tardío de la papa*. International Potato Center.
- Perez, W. G., Gamboa, J. S., Falcon, Y. V., Coca, M., Raymundo, R. M. and Nelson, R. J. (2001) Genetic structure of Peruvian populations of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, **91**, 956-965.
- Peters, R., Platt, H. W. and Hall, R. (1998) Changes in race structure of Canadian populations of *Phytophthora infestans* based on specific virulence to selected potato clones. *Potato Research*, **41**, 355-370.
- Petre, B., Morin, E., Tisserant, E., Hacquard, S., Da Silva, C., Poulain, J., *et al.* (2012) RNA-Seq of early-infected poplar leaves by the rust pathogen *Melampsora larici-populina* uncovers PtSultr3; 5, a fungal-induced host sulfate transporter. *PloS one*, **7**, e44408.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, **29**, e45.
- Pule, B., Meitz, J. C., Thompson, A., Linde, C., Fry, W., Langenhoven, S., *et al.* (2013) *Phytophthora infestans* populations in central, eastern and southern African countries consist of two major clonal lineages. *Plant pathology*, **62**, 154-165.
- Qutob, D., Tedman-Jones, J., Dong, S., Kuflu, K., Pham, H., Wang, Y., *et al.* (2009) Copy number variation and transcriptional polymorphisms of *Phytophthora sojae* RXLR effector genes *Avr1a* and *Avr3a*. *PloS one*, **4**, e5066.
- Raffaele, S., Win, J., Cano, L. M. and Kamoun, S. (2010) Analyses of genome architecture and gene expression reveal novel candidate virulence factors in the secretome of *Phytophthora infestans*. *BMC genomics*, **11**, 637.
- Rauscher, G. M., Smart, C. D., Simko, I., Bonierbale, M., Mayton, H., Greenland, A., *et al.* (2006) Characterization and mapping of R Pi-ber, a novel potato late blight resistance gene from *Solanum berthaultii*. *Theoretical and Applied Genetics*, **112**, 674-687.

- Rietman, H., Bijsterbosch, G., Cano, L. M., Lee, H.-R., Vossen, J. H., Jacobsen, E., *et al.* (2012) Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sarpo Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **25**, 910-919.
- Rivera, C., Tovar, J. C., Roman, M., Orbegoza, J., Serna-Chumbes, F., Manrique-Trujillo, S., *et al.* (2009) Genetic transformation of potato cultivars using R genes to increase resistance to late blight of potato caused by *Phytophthora infestans*. In: *15th Triennial ISTRC Symposium*.
- Robideau, G. P., De, C., ARTHUR, W., COFFEY, M. D., VOGLMAYR, H., BROUWER, H., *et al.* (2011) DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular ecology resources*, **11**, 1002-1011.
- Rodewald, J. and Trognitz, B. (2013) Solanum resistance genes against *Phytophthora infestans* and their corresponding avirulence genes. *Molecular plant pathology*, **14**, 740-757.
- Rodríguez-Falcón, M., Bou, J. and Prat, S. (2006) Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 151-180.
- Román, M. L., Rivera, C., Orbegoza, J., Serna, F., Gamboa, S., Perez, W., *et al.* (2015) Resistencia a *Phytophthora infestans* linaje clonal EC-1 en Solanum tuberosum mediante la introducción del gen RB. *Revista peruana de biología*, **22**, 63-70.
- Román, M. R., C; Lindqvist-Kreuze, H; Gamboa, S; Izarra, M; Kreuze, J; Forbes, G; Ghislain, M. (2016) La expresión del gen *Rpi-vnt1.1* en papa transgénica se relaciona con la resistencia a *Phytophthora infestans* y la expresión del gen *Avr-vnt1*. In: *RedBio2016*. Lima-Perú.
- Samen, F. A.-E., Secor, G. and Gudmestad, N. (2003) Variability in virulence among asexual progenies of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, **93**, 293-304.
- Sandbrink, J. M., Colon, L. T., Wolters, P. J. and Stiekema, W. J. (2000) Two related genotypes of Solanum microdontum carry different segregating alleles for field resistance to *Phytophthora infestans*. *Molecular Breeding*, **6**, 215-225.
- Sanju, S., Siddappa, S., Thakur, A., Shukla, P. K., Srivastava, N., Pattanayak, D., *et al.* (2015) Host-mediated gene silencing of a single effector gene from the potato pathogen *Phytophthora infestans* imparts partial resistance to late blight disease. *Functional & integrative genomics*, **15**, 697-706.
- Saville, A. C., Martin, M. D. and Ristaino, J. B. (2016) Historic Late Blight Outbreaks Caused by a Widespread Dominant Lineage of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *PloS one*, **11**, e0168381.
- Sedano, J. C. S. and Carrascal, C. E. L. (2012) RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Árbitros externos*, **16**, 101-113.
- Shattock, R., Janssen, B., Whitbread, R. and Shaw, D. (1977) An interpretation of the frequencies of host specific phenotypes of *Phytophthora infestans* in North Wales. *Annals of Applied Biology*, **86**, 249-260.
- Siddappa, S., Tiwari, J. K., Sindhu, R., Sharma, S., Bhardwaj, V., Chakrabarti, S., *et al.* (2014) *Phytophthora infestans* associated global gene expression profile in a late blight resistant Indian potato cv. Kufri Girdhari. *Australian Journal of Crop Science*, **8**, 215.
- Śliwka, J., Jakuczun, H., Lebecka, R., Marczewski, W., Gebhardt, C. and Zimnoch-Guzowska, E. (2006) The novel, major locus *Rpi-phu1* for late blight

- resistance maps to potato chromosome IX and is not correlated with long vegetation period. *Theoretical and Applied Genetics*, **113**, 685-695.
- Smilde, W., Brigneti, G., Jagger, L., Perkins, S. and Jones, J. (2005) Solanum mochiquense chromosome IX carries a novel late blight resistance gene Rpi-moc1. *Theoretical and Applied Genetics*, **110**, 252-258.
- Song, J., Bradeen, J. M., Naess, S. K., Raasch, J. A., Wielgus, S. M., Haberlach, G. T., *et al.* (2003) Gene RB cloned from Solanum bulbocastanum confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 9128-9133.
- Stefańczyk, E., Sobkowiak, S., Brylińska, M. and Śliwka, J. (2017) Expression of the potato late blight resistance gene Rpi-phu1 and Phytophthora infestans effectors in the compatible and incompatible interactions in potato. *Phytopathology*.
- Tameling, W. I. and Takken, F. L. (2008) Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *European journal of plant pathology*, **121**, 243-255.
- Tan, M. A., Hutten, R. C., Celis, C., Park, T.-H., Niks, R. E., Visser, R. G., *et al.* (2008) The RPi-mcd1 locus from Solanum microdontum involved in resistance to Phytophthora infestans, causing a delay in infection, maps on potato chromosome 4 in a cluster of NBS-LRR genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 909-918.
- Thakur, A., Sanju, S., Srivastava, S. S. N., Shukla, P. K., Pattanayak, D., Sharma, S., *et al.* (2015) Artificial microRNA mediated gene silencing of Phytophthora infestans single effector Avr3a gene imparts moderate type of late blight resistance in potato. *Plant Pathology Journal*, **14**, 1.
- Trapnell, C., Pachter, L. and Salzberg, S. L. (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, **25**, 1105-1111.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., *et al.* (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols*, **7**, 562-578.
- Turkensteen, L. (1993) Durable resistance of potatoes against Phytophthora infestans. *Durability of disease resistance*, 115-124.
- van Eck, H. J. (2007) *Genetics of morphological and tuber traits*. Amsterdam: El servier.
- Vermeulen, J., De Preter, K., Lefever, S., Nuytens, J., De Vloed, F., Derveaux, S., *et al.* (2011) Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic acids research*, **39**, e63-e63.
- Villamon, F. G., Spooner, D., Orrillo, M., Mihovilovich, E., Perez, W. and Bonierbale, M. (2005) Late blight resistance linkages in a novel cross of the wild potato species Solanum paucissectum (series Piurana). *Theoretical and applied genetics*, **111**, 1201-1214.
- Vleeshouwers, V. G. and Oliver, R. P. (2014) Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *Molecular plant-microbe interactions*, **27**, 196-206.
- Vleeshouwers, V. G., Raffaele, S., Vossen, J. H., Champouret, N., Oliva, R., Segretin, M. E., *et al.* (2011) Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. *Annual review of phytopathology*, **49**, 507-531.
- Vleeshouwers, V. G., Rietman, H., Krenek, P., Champouret, N., Young, C., Oh, S.-K., *et al.* (2008) Effector genomics accelerates discovery and functional

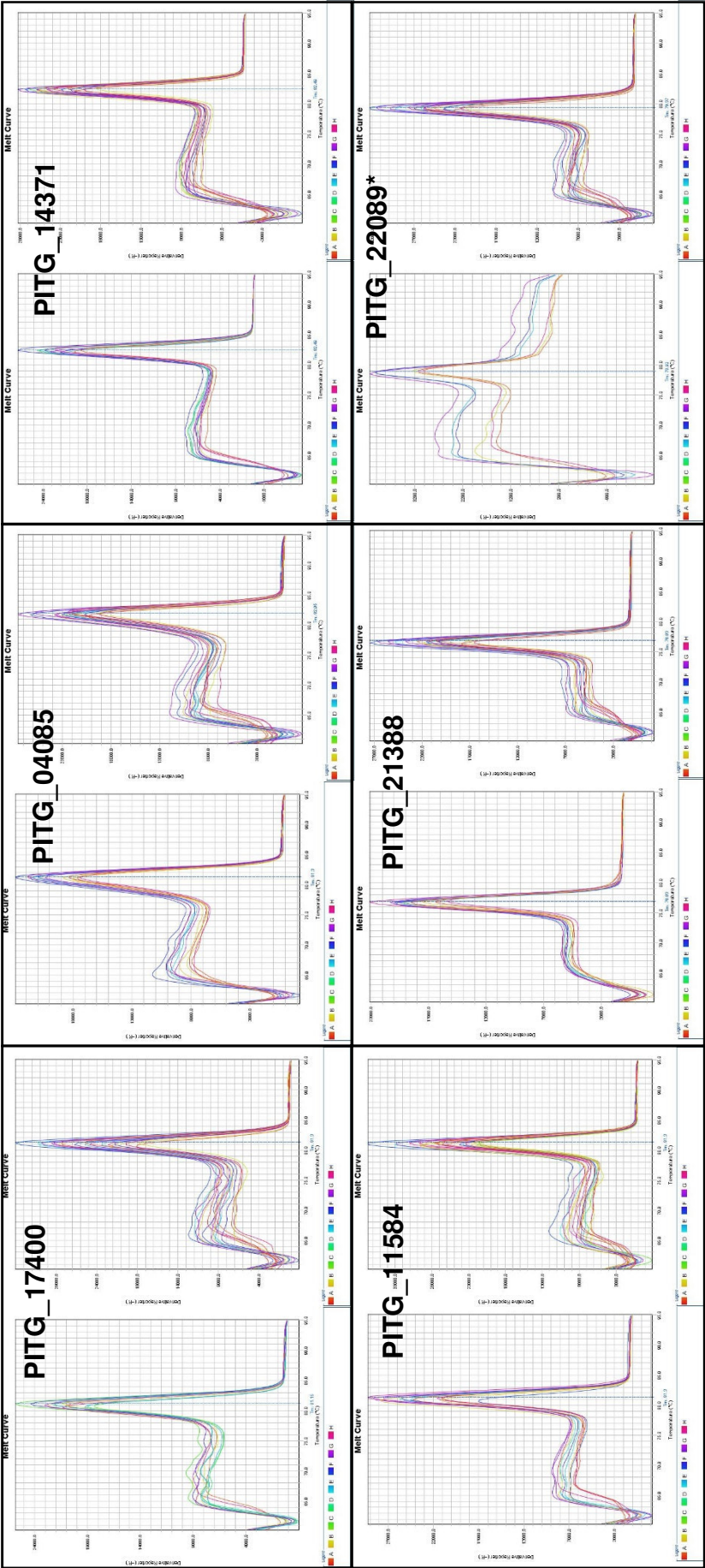
- profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. *PLoS One*, **3**, e2875.
- Vleeshouwers, V. G., van Dooijeweert, W., Govers, F., Kamoun, S. and Colon, L. T. (2000) The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta*, **210**, 853-864.
- Vossen, E. A., Gros, J., Sikkema, A., Muskens, M., Wouters, D., Wolters, P., *et al.* (2005) The Rpi-blb2 gene from *Solanum bulbocastanum* is an Mi-1 gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *The Plant Journal*, **44**, 208-222.
- Wang, J., Fernández-Pavía, S. P., Larsen, M. M., Garay-Serrano, E., Gregorio-Cipriano, R., Rodríguez-Alvarado, G., *et al.* (2017) High levels of diversity and population structure in the potato late blight pathogen at the Mexico centre of origin. *Molecular Ecology*, **26**, 1091-1107.
- Wang, Q., Han, C., Ferreira, A. O., Yu, X., Ye, W., Tripathy, S., *et al.* (2011) Transcriptional programming and functional interactions within the *Phytophthora sojae* RXLR effector repertoire. *The Plant Cell*, **23**, 2064-2086.
- Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, **10**, 57-63.
- Ward, J. A., Ponnala, L. and Weber, C. A. (2012) Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *American Journal of Botany*, **99**, 267-276.
- Wei, F., Wing, R. A. and Wise, R. P. (2002) Genome dynamics and evolution of the Mla (powdery mildew) resistance locus in barley. *The Plant Cell Online*, **14**, 1903-1917.
- Whisson, S. C., Boevink, P. C., Moleleki, L., Avrova, A. O., Morales, J. G., Gilroy, E. M., *et al.* (2007) A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature*, **450**, 115-118.
- Wong, M. L. and Medrano, J. F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, **39**, 75.
- Wu, T. D. and Nacu, S. (2010) Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics*, **26**, 873-881.
- Yin, J., Gu, B., Tian, Y., Huang, G., Quan, J., Lindqvist-Kreuzer, H., *et al.* (2017) Conserved RXLR effector genes of *Phytophthora infestans* expressed at the early stage of potato infection are suppressive to host defense. *Frontiers in plant science*, **8**, 2155.
- Zarzycka, H. (1996) Effect of various methods of maintenance of *Phytophthora infestans* on its pathogenicity to potato. *Plant Breeding and Seed Science*, **40**.
- Zarzycka, H. (2001) Evaluation of resistance to *Phytophthora infestans* in detached leaflet assay. Preparation of the inoculum. In: *The methods of evaluation and selection applied in potato research and breeding*. (E. Zimnoch-Guzowska, J. Syller and Sieczka, M., eds.). Monografie i rozprawy naukowe 10a/2001.: IHAR Radzików, pp. 75-77.
- Zuluaga, A. P., Vega-Arreguín, J. C., Fei, Z., Ponnala, L., Lee, S. J., Matas, A. J., *et al.* (2016) Transcriptional dynamics of *Phytophthora infestans* during sequential stages of hemibiotrophic infection of tomato. *Molecular plant pathology*, **17**, 29-41.

IX. Anexos

Anexo 1. Genes que mostraron diferencias significativas entre cepas por el análisis de *cuffdiff* sin filtrado.
*Considerados luego de la filtración.

Nº	gen	locus	status	POX067	POX109	p_value	significancia
1	PITG_00149*	supercont1.1:963922-969271	OK	6.79503	29.4259	0.0002	si
2	PITG_07857	supercont1.12:852875-854405	OK	0	8.56592	5.00E-05	si
3	PITG_08181	supercont1.12:2751122-2753196	OK	0	7.97426	5.00E-05	si
4	PITG_09128*	supercont1.14:632502-633086	OK	41.4947	0	0.00015	si
5	PITG_08941	supercont1.16:1828529-1829609	OK	0	11.9255	0.00015	si
6	PITG_20539	supercont1.160:165435-167321	OK	0	13.1618	5.00E-05	si
7	PITG_10279	supercont1.18:376877-484539	OK	0	28.6057	5.00E-05	si
8	PITG_22089*	supercont1.1810:1161-1569	OK	0	126.529	5.00E-05	si
9	PITG_22675*	supercont1.2:208469-208832	OK	37.4164	0	5.00E-05	si
10	PITG_12003	supercont1.21:1631559-1633519	OK	0	9.12372	5.00E-05	si
11	PITG_11584*	supercont1.22:551349-552577	OK	109.935	15.8694	0.00015	si
12	PITG_14694	supercont1.36:995700-996960	OK	0	6.85024	0.00025	si
13	PITG_15051	supercont1.38:558208-559632	OK	0	7.51548	5.00E-05	si
14	PITG_22547*	supercont1.3922:1354-1777	OK	35.6536	0	5.00E-05	si
15	PITG_03580	supercont1.4:2346044-2347947	OK	0	15.5962	5.00E-05	si
16	PITG_03862	supercont1.4:3730518-3730878	OK	0	52.419	5.00E-05	si
17	PITG_16294*	supercont1.45:154222-154684	OK	35.0965	0	5.00E-05	si
18	PITG_04263	supercont1.5:2614952-2616876	OK	0	7.02222	5.00E-05	si
19	PITG_04169*	supercont1.5:1760653-1761016	OK	0	38.8476	5.00E-05	si
20	PITG_17343	supercont1.53:780811-782774	OK	0	7.37054	5.00E-05	si
21	PITG_17400*	supercont1.54:307423-308693	OK	126.332	20.1718	5.00E-05	si
22	PITG_17491,PITG_17492	supercont1.58:191102-195391	OK	31.7718	5.56815	0.00025	si
23	PITG_05911*	supercont1.9:1500619-1501027	OK	0	69.4169	5.00E-05	si

Anexo 2. Curvas de disociación de los productos de PCR amplificados con los pares de cebadores mostrados en la tabla 2, cada gen fue analizado al 3dpi. Con las cepas POX109 y POX067 (izquierda) y POX096, POX106 y POX110 (derecha). *Para PITG_22089 en la figura izquierda sólo fue analizado con la cepa POX109, en POX067 no hubo detección de fluorescencia.



Anexo 3. Resultados de ANOVA para los genes de la tabla 2 analizadas sus expresiones relativas por el programa SAS®.

a. PITG_16294

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	1.49384240	0.37346060	310.88	<.0001
Error	5	0.00600650	0.00120130		
Corrected Total	9	1.49984890			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean	
	0.995995	12.78487	0.034660	0.271100	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tra	4	1.49384240	0.37346060	310.88	<.0001

b. PITG_17400

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	758.5143844	189.6285961	7.79	0.0224
Error	5	121.7253060	24.3450612		
Corrected Total	9	880.2396904			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean	
	0.861713	73.88989	4.934071	6.677600	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tra	4	758.5143844	189.6285961	7.79	0.0224

c. PITG_11584

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	25.53717740	6.38429435	1.36	0.3666
Error	5	23.53724900	4.70744980		
Corrected Total	9	49.07442640			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean		
0.520376	166.7178	2.169666	1.301400		
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tra	4	25.53717740	6.38429435	1.36	0.3666

d. PITG_04085

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	13.53729260	3.38432315	0.69	0.6278
Error	5	24.40767500	4.88153500		
Corrected Total	9	37.94496760			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean		
0.356761	131.2942	2.209420	1.682800		
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tra	4	13.53729260	3.38432315	0.69	0.6278

e. PITG_21388

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	32.96050240	8.24012560	0.69	0.6269
Error	5	59.28859050	11.85771810		
Corrected Total	9	92.24909290			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean		
0.357299	171.8401	3.443504	2.003900		
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tra	4	32.96050240	8.24012560	0.69	0.6269

f. PITG_14371

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	2.50550260	0.62637565	1.31	0.3786
Error	5	2.38382100	0.47676420		
Corrected Total	9	4.88932360			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean		
0.512444	98.52756	0.690481	0.700800		
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tra	4	2.50550260	0.62637565	1.31	0.3786

g. PITG_22089

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	2.01301640	0.50325410	2.91	0.1363
Error	5	0.86570850	0.17314170		
Corrected Total	9	2.87872490			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean		
0.699274	92.90087	0.416103	0.447900		
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tra	4	2.01301640	0.50325410	2.91	0.1363